

Středoškolská odborná činnost

Obor SOČ: 04. Biologie

**Padesát odstínů slunéčka
východního a pohlavně
přenosná choroba**

Lukáš Fiedler

České Budějovice 2016

Středoškolská odborná činnost
Obor SOČ: 04. Biologie

Padesát odstínů slunéčka východního a pohlavně přenosná choroba

**Fifty shades of the harlequin ladybird
and a sexually transmitted disease**

Autor: Lukáš Fiedler
lukifidli@seznam.cz, tel: 602 872 185

Škola: Gymnázium, České Budějovice, Jírovцова 8, 37161

Kraj: Praha

Školitel: doc. RNDr. Oldřich Nedvěd, CSc.,
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích
a Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR, v. v. i.

Oponent: doc. RNDr. Alois Honěk, CSc.,
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

České Budějovice 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady uvedené v seznamu vloženém v práci SOČ.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Českých Budějovicích dne podpis:

Poděkování

Za seznámení s problematikou, ochotu, vytrvalé vedení, nekonečnou trpělivost, plodné konzultace, cennou pomoc, entomologické výlety, pozvání na semináře a konference, knihy, výtečný čaj, skvělé zázemí a všechno, co mě naučil, děkuji doc. RNDr. Oldřichu Nedvědovi CSc.

Děkuji Mgr. Jarmile Ichové za bezproblémový přístup ke školnímu mikroskopu RTL PC-2. Třídnímu učiteli, Mgr. Radkovi Trčovi, děkuji za vstřícnost při vyřizování absence.

Dále děkuji své rodině za projevenou podporu a pochopení mé zaneprázdněnosti.

Anotace

V předkládané práci se zabývám fyziologickou a reprodukční charakteristikou a parazity sluněček východních (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773); Coleoptera: Coccinellidae) nasbíraných během podzimní migrace v roce 2014.

U všech jedinců jsem zaznamenal čerstvou hmotnost, tělesné rozměry, pohlaví, zbarvení, parazitaci houbou *Hesperomyces virescens*, u samic případné oplození. Z krovek jsem etanolem extrahoval karotenoidy a jejich koncentraci změřil na spektrofotometru jako absorbanci při 450 nm. Část samic jsem vyšetřil na přítomnost hlístic *Parasitylenchus bifurcatus* v tělní dutině.

Naměřená absorbance extraktu z krovek během sezóny poklesla. Starší červení jedinci tedy odmigrovali na zimoviště, jakmile to šlo, mladší oranžoví k tomu dospívali postupně. Oplozených starších červených samic bylo 77 %; mladších oranžových 39 %; žlutých 36 %; melanických 48 %. Oplozené (= spárené) samice byly parazitované více (36 %) než neoplozené (11 %). *H. virescens* se tedy právem považuje za pohlavně přenosnou chorobu. První na světě ukazují nižší hmotnost rozsáhleji napadených sluněček. Jedinci formy *succinea* s malou frakcí černé na krovkách měli vysokou koncentraci karotenoidů, což potvrzuje, že pod černou kutikulou epidermální buňky karotenoidy neukládají. V později nasbíraných vzorcích bylo více melanizovaných jedinců formy *succinea*. Ti se totiž líhli krátce před migrací za nízkých teplot, které u nich melanizaci vyvolaly.

Ko-infekce *H. virescens* i *P. bifurcatus* se vyskytla u 14 % vyšetřených samic, které byly těžší a měly více karotenoidů v krovkách než samice zdravé či napadené jen jedním z parazitů.

Výsledky této práce budou publikovány jako součást vědeckého článku s celosvětovým kolektivem autorů v mezinárodním impaktovaném časopise BioControl.

Klíčová slova: *Harmonia axyridis*; *Hesperomyces virescens*; karotenoidy; migrace; *Parasitylenchus bifurcatus*

Annotation

In this work I am dealing with a physiological and reproductive characterisation and parasites of the harlequin ladybirds (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773); Coleoptera: Coccinellidae) collected during their autumn migration in 2014.

I recorded fresh mass, body size, sex, colouration and the presence of a parasitic fungus *Hesperomyces virescens* in every individual and dissected females for detection of sperm in the spermatheca. Carotenoids were extracted from elytra in ethanol and their concentration was estimated spectrophotometrically as absorbance at 450 nm. I examined part of females for presence of *Parasitylenchus bifurcatus* nematodes in the body cavity.

The elytra extract absorbance decreased during season. The red older individuals migrated as soon as possible, while the younger orange ones came to it gradually. There were 77 % of the red older females mated, 39 % of the younger orange females, 36 % of the yellow females and 48 % of the melanic females mated at the time of migration. When analyzed by infection status, 36 % of infected females were mated, while 11 % of uninfected females were mated. Therefore *H. virescens* is rightfully considered to be a sexually transmitted disease. Here I provide the first evidence worldwide for lower body mass in heavily infected individuals compared to healthier individuals. Individuals of the morph *succinea* with smaller fraction of the elytra covered in black were more carotenoid-rich. That means that epidermal cells do not store the carotenoids underneath the black cuticle. There were more individuals of the morph *succinea* that were heavily spotted in later samples because they moulted recently before the migration at lower temperatures causing increased melanisation.

The co-infection with both parasites occurred in 14 % of the females examined. These females had higher body mass and carotenoid contents in elytra compared to uninfected or single infected ones.

Final results of this work are going to be published as a part of a scientific article with a worldwide author team in an international impacted journal BioControl.

Key words: *Harmonia axyridis*; *Hesperomyces virescens*; carotenoids; migration; *Parasitylenchus bifurcatus*

Obsah

1. Úvod.....	9
1.1 Slunéčko východní.....	9
1.2 Biogeografie	9
1.2.1 Původní výskyt	9
1.2.2 Introdukce pro biologickou ochranu, invaze a efekt předmostí	9
1.2.3 Česká republika	10
1.3 Popis a bionomie.....	11
1.3.1 Základní popis imaga, sexuální dimorfismus.....	11
1.3.2 Vývojový cyklus	11
1.3.3 Trofická nika	11
1.3.4 Velikost těla a potravní specializace afidofágních slunéček	11
1.3.5 Habitatová preference	12
1.3.6 Behaviorální vzorce spojené s diapauzou	12
1.4 Zbarvení.....	13
1.4.1 Barevné formy.....	13
1.4.2 Dědičnost zbarvení.....	15
1.4.3 Termální melanismus	15
1.4.4 Zbarvení štítu	16
1.4.5 Ontogenetické mechanismy tvorby černého vzoru	16
1.4.6 Causa karotenoidy.....	17
1.4.7 Barevné formy a pohlavní výběr	18
1.5 Zbarvení v kontextu aposematismu.....	19
1.5.1 Význam a původ zbarvení slunéček	19
1.5.2 Aposematismus.....	19
1.5.3 Müllerovské mimikry.....	19
1.5.4 Chemická obrana a reflexní krvácení	19
1.5.5 Náklady na produkci aposematických sloučenin, věrohodnost signalizace.....	20
1.5.6 Interakce s ptačím predátorem.....	21
1.6 Přírodní nepřátelé a biologický boj	21
1.6.1 Významné teorie biologie invazních druhů.....	22
1.6.2 Bakterie zabíjející samce	22
1.6.3 Hlístice <i>Parasitylenchus bifurcatus</i>	22
1.6.4 Houba <i>Hesperomyces virescens</i>	23

1.6.5 Ko-infekce.....	27
1.7 Užitečnost a škodlivost.....	27
1.7.1 Užitečnost	27
1.7.2 Škodlivost	28
2. Cíle práce.....	30
3. Materiál a metodika	31
3.1 Materiál.....	31
3.2 Zpracování.....	31
4. Výsledky	37
4.1 Zastoupení pohlaví a forem, reprodukční stav	37
4.2 Subjektivní charakteristika formy <i>succinea</i>	37
4.3 Tělesné rozměry	37
4.4 Hmotnost	38
4.5 Proměnlivost sledovaných parametrů během podzimní migrace	38
4.6 Migrace různě melanizovaných jedinců formy <i>succinea</i>	41
4.7 Proměnlivost sledovaných parametrů během dne a během sezóny.....	42
4.8 Analýza barvy	43
4.9 Detailní analýza parazitovanosti houbou <i>Hesperomyces virescens</i>	45
4.10 Samice vyšetřené na přítomnost hlístic	47
5. Diskuse.....	48
5.1 Zastoupení pohlaví a forem, reprodukční stav	48
5.2 Tělesné rozměry a hmotnost	48
5.3 Proměnlivost sledovaných parametrů během podzimní migrace	49
5.4 Migrace různě melanizovaných jedinců formy <i>succinea</i>	49
5.5 Proměnlivost sledovaných parametrů během dne a během sezóny.....	49
5.6 Analýza barvy	50
5.7 Detailní analýza parazitovanosti houbou <i>Hesperomyces virescens</i>	51
5.8 Samice vyšetřené na přítomnost hlístic	54
6. Shrnutí a přínosy práce.....	56
7. Seznam zkratk.....	57
8. Seznam literatury	58

1. Úvod

1.1 Slunéčko východní

Invazní druhy jsou zvířata, rostliny nebo jiné organismy vysazené lidmi mimo původní prostředí, kde se šíří a negativně ovlivňují biodiverzitu i ekosystémy. Dopady slunéčka *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) jakožto invazního druhu jsou Mezinárodním svazem ochrany přírody považovány za „ohromné, nevypočitatelné a mnohdy nezvratné“ (International Union for Conservation of Nature, 2011).

Slunéčko *H. axyridis* je známé pod mnoha jmény: mnohobarevné asijské slunéčko, slunéčko Halloweenové či slunéčko harlekýn (Staverlokk *et al.*, 2007). Zde budu užívat široce přijímaný český ekvivalent: slunéčko východní.

1.2 Biogeografie

1.2.1 Původní výskyt

Slunéčko východní je původní ve Východní Asii, recentně byl rozsah jeho přirozeného areálu zrevidován (Orlova-Bienkowskaja *et al.*, 2015). Vyskytuje se na jihovýchodě Západní Sibíře, jihu Východní Sibíře, jihu ruského Dálného východu, v Mongolsku, Číně, Severní i Jižní Koreji, Japonsku a na severu Vietnamu. Severovýchod Kazachstánu a sever Kyrgyzstánu podle nových poznatků do přirozeného areálu nepatří, protože mezi těmito hornatými oblastmi a nejbližší částí nativního areálu (Altaj) se rozkládá Balkašská poušť (600 km). Rozsáhlá analýza dat ukázala, že *H. axyridis* se v severovýchodním Kazachstánu a v Kyrgyzstánu objevila až po postavení Turkestánsko-sibiřské železnice, dráhy spojující Střední Asii a Sibiř.

1.2.2 Introdukce pro biologickou ochranu, invaze a efekt předmostí

Historie introdukcí pro biologickou ochranu a následného šíření slunéčka východního po celém světě je úzce spjata s takzvaným efektem invazního předmostí (*the invasive bridgehead effect*; Lombaert *et al.*, 2010). Koncept efektu předmostí předpokládá, že ohromné celosvětové invaze některých organismů se nešířily z původního areálu, ale z nějaké omezené (avšak úspěšně uchycené) invazní populace.

V původním areálu jsou patrné dvě geneticky odlišné geografické populace: na západ od řeky Jenisej a jezera Bajkal dominuje melanická forma *axyridis*, zatímco východní část obývá hlavně forma *succinea* (Belyakova, 2013; Dobzhansky, 1933).

Populace slunéčka východního (původem z Japonska) byla úplně poprvé pro biologickou ochranu rostlin vypuštěna v roce 1916 v USA (Iablokoff-Khnzorian, 1982 *ex* Brown *et al.*, 2011) a dalších alespoň čtrnáct introdukcí z Číny následovalo (Gordon, 1985 *ex* Brown *et al.*, 2011).

Navzdory mnohým dalším pokusům o vysazení na různých kontinentech se invazním předmostím stala Severní Amerika po dvou nezávislých introdukcích z původního areálu: na východním pobřeží (zaznamenáno 1988) a na západním pobřeží (1991). Invazní

americké populace pak představovaly zdroj pro invazi do Afriky, Jižní Ameriky a na západ Evropy, kde došlo k jejich zkřížení s evropským laboratorním kmenem prodáváním pro biologickou ochranu (Lombaert *et al.*, 2014).

Je evidentní, že vysvětlovací aparát efektu předmostí je evolučně parsimonní: vyžaduje jednorázovou změnu (mutaci) v jediné introdukované populaci, zatímco při mnohonásobných introdukcích by byly nutné opakované změny propůjčující sluněčkům schopnost invaze (Estoup & Guillemaud, 2010). Porovnávání invazních a původních nebo laboratorních populací může přinést nesmírně cenné poznatky o roli adaptace a náhody v invazním úspěchu sluněčka východního (Lombaert *et al.*, 2014).

K introdukci sluněček východních do Severní Ameriky byla využita jen malá část původní populace, došlo tedy k náhlému snížení populační velikosti. To obvykle vede ke snížení genetické diverzity (počtu alel) a k vyšší incidenci příbuzenského křížení (*inbreeding*), které může vyústit ve snížení fitness inbredních potomků. Popsaný fenomén se nazývá efekt hrdla láhve (*the bottleneck effect*; Nei *et al.*, 1975). Facon *et al.* (2011) prokázali, že sluněčka z východní americké populace prošla středně vážným hrdlem láhve a že oproti jedincům z původního areálu nevykazovala téměř žádnou inbrední depresi. Efekt hrdla láhve tedy nejenže nezafungoval jako bariéra proti invazi, ale dokonce sluněčka zbavil škodlivých alel, a umožnil tak zachování vysoké fitness navzdory příbuzenskému křížení.

Obecně se pro invazní druhy hmyzu hromadí množství důkazů o tom, že mnohonásobné introdukce, komplexní globální šíření a křížení populací v invadovaném areálu jsou jevy naprosto běžné (Garnas *et al.*, 2016). Historická paradigmata se přehodnocují, například efekt zakladatele (*founder effect*, jev v podstatě podobný efektu hrdla láhve) jen zřídka limituje fitness invazního hmyzu. Propojenost disjunktních oblastí globálního invazního areálu je mnohem vyšší, než se očekávalo, a navíc asymetrická – různé populace přispívají k šíření neúměrně.

1.2.3 Česká republika

V roce 2003 byla do chmelnic na severozápadě ČR bez trvalého uchycení vysazena linie sluněčka východního neschopná letu. Invazní populace pak přišla do ČR z centra šíření v Belgii a Nizozemí přes Německo, první jedinci byli zaznamenáni v roce 2006, od roku 2007 pak probíhalo šíření jednak jako plošná vlna od severozápadu, jednak kruhově z velkých měst do okolí (Brown *et al.*, 2008; Nedvěd 2014). V Evropě se dnes (2016) vyskytuje téměř všude, kromě nejteplejších středomořských oblastí (Nedvěd, 2015).

Jelikož legislativa, výzkum a management invazních druhů (IAS = *invasive alien species*) nejsou mezinárodně plně koordinovány, bývá za relativně standardizovaný přístup považováno vytváření jejich seznamů s příslušnou kategorizací, které následně slouží jako výchozí bod pro vyjasnění priorit ohledně prevence, regulace a dalších opatření. Pergl *et al.* (2016) recentně sestavili Černý, Šedý a Varovný seznam nepůvodních druhů pro Českou republiku. *H. axyridis* je řazena do třetí kategorie Černého seznamu (BL3), z hmyzu například spolu s klíněnkou jírovcovou (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimic, 1986) a blánatkou lipovou (*Oxycarenus lavaterae* (Fabricius, 1787)). Zmíněná kategorie má zahrnovat druhy, jejichž současné rozšíření pramení buďto ze spontánního šíření, nebo z nezáměrných introdukcí člověkem. Navrhován je

individualizovaný přístup balancující mezi lokálními potřebami a dostupnými prostředky k eradikaci.

1.3 Popis a bionomie

1.3.1 Základní popis imaga, sexuální dimorfismus

Velikost 5-8 mm, tělo široce oválné, 1,3-1,4× delší než široké, silně klenuté. Krovky jsou nerovnoměrně jamkované, v přední třetině mají výrazný plochý okraj a v zadní části často příčnou lištu – autozomálně dominantní znak s jednoduchou mendelovskou dědičností nezávislou na barevném vzoru krovek (Komai *et al.*, 1950). Příčná lišta je spolu s barevnou formou *succinea* charakteristická pro východní část původního areálu (Belyakova, 2011). Štítek je 12-15×, epipleury 7-8× užší než tělo. Výběžek předoprsí nese dvě rovnoběžná žebírka (Nedvěd, 2015).

Tvar distálního okraje pátého viditelného břišního článku (abdominálního sternitu) je u samců konkávní, zatímco u samic konvexní. Svrchní pysk (labrum) a předoprsí (prosternum) samic jsou obvykle černé. Samci mají bílé až špinavě hnědé předoprsí a svrchní pysk. U samic je pak pigmentace tím intenzivnější, v čím nižší teplotě se vyvíjely a čím delší doba uplynula od vylíhnutí z kukly. Pro samce platí negativní závislost na teplotě rovněž (McCornack *et al.*, 2007), ale melanizace je menšího rozsahu než u samic (Knapp & Nedvěd, 2013).

1.3.2 Vývojový cyklus

H. axyridis podobně jako jiná afidofágní slunéčka prochází při holometabolním vývoji stádiem vajíčka, čtyř larválních instarů oddělených svlékáním kutikuly, stádiem kukly a dospělce. Svlečka čtvrtého instaru zůstává shrnutá v místě přitmělení kukly k podkladu (Koch *et al.*, 2003).

1.3.3 Trofická nika

Je to polyfágní predátor mšic, ale může se živit i sviluškami, merami, korovnicemi, červci, larvami a vajíčky mandelinek, nosatců, motýlů a jiných druhů slunéček. Dále může požídat pyl a nektar rostlin (Koch *et al.*, 2003). V Americe bylo rovněž zaznamenáno okusování dýní, jablek, hroznového vína a malin (Koch *et al.*, 2004). Larvy druhého a třetího instaru mohou pak okusovat sazeničky kukuřice (Moser & Obrycki, 2009).

1.3.4 Velikost těla a potravní specializace afidofágních slunéček

Afidofágní slunéčka jsou značně proměnlivá ve velikosti. Má se za to, že tělesná velikost je asi nejdůležitější faktor, který leží na pozadí jejich potravní specializace. Velikost slunéčka je pravděpodobně úzce asociována s velikostí a denzitou kořisti (= mšic). Malá slunéčka se mohou živit malými mšičími druhy bez ohledu na jejich denzitu, ale těmi velkými jenom při vysokých denzitách, kdy se kolem vyskytuje dost mladých a polapitelných instarů. Velká slunéčka se zase při nízkých denzitách malých mšic nenasytí. Potravní specialisté se velikostí podobají kořisti a při jejích nízkých denzitách se díky své efektivní lovicí schopnosti nasytí. Potravní generalisté však vyznávají strategii

„jedna velikost postačí na všechno,“ jsou středně velcí a kvůli své nižší efektivitě vyžadují vyšší denzitu kořisti (Sloggett, 2008).

1.3.5 Habitatová preference

H. axyridis žije hlavně na listnatých stromech a keřích, méně často na bylinách a jehličnanech, zvláště hojná je v obcích, parcích, zahradách a ve stromořadích. Velmi často se vyskytuje na lípě, peckovinách, okrasných keřích či kopřivách (Nedvěd, 2015). Obecně je považována za semi-arboreální druh (Hodek, 1973).

1.3.6 Behaviorální vzorce spojené s diapauzou

H. axyridis je obvykle bivoltinní, ale v Řecku a v severní Itálii může mít až čtyři překrývající se generace za rok (Bazocchi *et al.*, 2004; Katsoyannos *et al.*, 1997). Fenologická data ukazují, že se oproti původním druhům slunéček dokáže množit i pozdě na podzim (Adriaens *et al.*, 2007). Z východní Sibíře je známo, že vajíčka mohli ve stejné sezóně klást jenom dospělci, kteří se vylíhli ještě před prostředkem srpna (Telenga & Bogunova, 1936 *ex* Hodek, 2012). Dospělá slunéčka východní žijí obvykle 30 až 90 dní, ale mohou se dožít až tří let (Koch *et al.*, 2003).

Diapauza bývá navozena okolními podmínkami, které signalizují sezónní změny. Jejimi adaptivními funkcemi jsou: (i) synchronizace vývoje aktivních stádií s příhodnými podmínkami, (ii) posílení přežívacího potenciálu během nepříznivých období (Hodek, 2012).

Slunéčkovití brouci při navození diapauzy mění své chování. Právě *H. axyridis* patří mezi druhy, které podnikají dlouhé migrační lety a na místě vhodném k zimování vytvářejí ohromné agregace, ve kterých mohou setrvat mnoho měsíců. Není bez zajímavosti, že se tyto adaptace nejčastěji vyvinuly u afidofágních slunéček tribu Coccinellini (Hodek, 2012).

Chování spojené s diapauzou má několik fází. Pre-diapauzní fáze zahrnuje strádání energetických zásob na hibernaci, pak následuje samotná migrace na zimoviště, vytvoření agregace, přečkání zimy a opětovné rozlétnutí do okolí (Hodek, 2012). Jedinci *H. axyridis* jsou lákáni z velké dálky na dobře patrná kontrastní místa v krajině, jako jsou například velké bílé zdi domů nebo vyvýšené skály (Nalepa *et al.*, 2005), kde následně vytvářejí agregace. Po přilétnutí na nápadné místo jsou svými specifickými reakcemi na fyzikální faktory (hydrotaxe, termotaxe, negativní fototaxe atd.) slunéčka „navedena“ do mikrohabitatů, které pak slouží jako úkryty (Hodek, 2012). Lákání kontrastní plochou a tendence k zalézání do úkrytů využívá tzv. šterbinový lapač (Nedvěd, 2013). *H. axyridis* vykazuje porovnatelné až vyšší přežívání zimního období než běžné druhy původních slunéček, což vede k velké jarní post-hibernační populaci (Raak-van den Berg *et al.*, 2012).

H. axyridis při tvorbě agregací využívá semiochemikálií. Jde o dvě různé směsi nasycených i nenasycených uhlovodíků s dlouhými řetězci (cca 30 atomů C), první slouží k navedení konspecifických jedinců k místu agregace, druhá zajišťují její kohezi (Durieux *et al.*, 2012; Durieux *et al.*, 2013). Zdá se, že chemické značky, které jedinci jednu sezónu zanechají v místě zimoviště, následující rok již nepostačují k vyvolání shlukovacího chování (Durieux *et al.*, 2014).

1.4 Zbarvení

1.4.1 Barevné formy

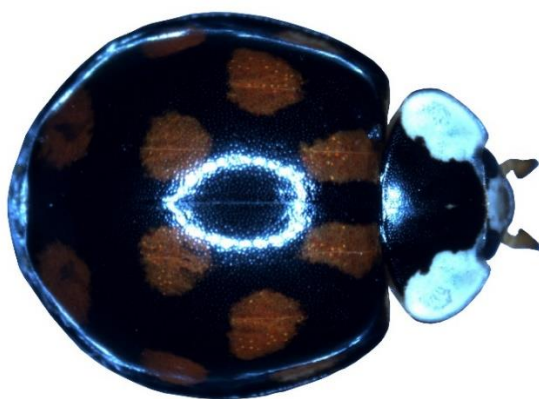
Slunéčko východní je nesmírně proměnlivé ve zbarvení krovek. Jeho všelijaké barevné formy byly na přelomu 18. a 19. století starou školou taxonomických entomologů dokonce popsány nejen jako různé druhy, ale dokonce jako různé rody slunéček (Tan, 1946). V zásadě se dají běžné formy rozdělit na „červené s černými“ a „černé s červenými“ puntíky.

První skupinu, nemelanické formy, zastupuje forma *succinea*, která dominuje na východě původního areálu (Obr. 1; Belyakova, 2013; Dobzhansky, 1933) a tvoří 80 až 90 % jedinců v invazních populacích, což je mimochodem také důvod, proč se mnoho studií *H. axyridis* tváří, jako by jiné formy ani neexistovaly (např. Bezzerides *et al.*, 2007; Bezzerides & Loofbourrow, 2014; Sun, 2015). Forma *succinea* obvykle nese na každé krovce deset černých skvrn (blíže viz 1.4.3).

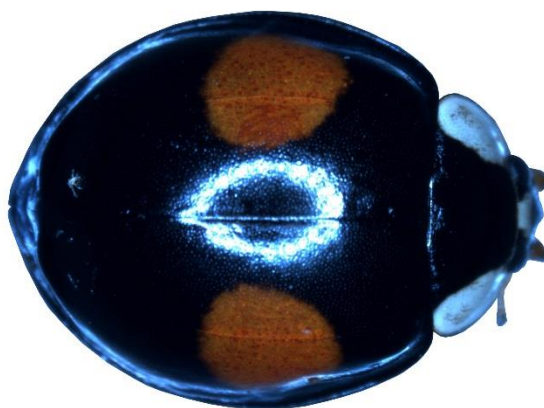


Obrázek 1: *Harmonia axyridis* f. *succinea*; středně melanizovaný jedinec; ($\beta = 5,08$ mm; viz Obr. 10); vlastní fotografie.

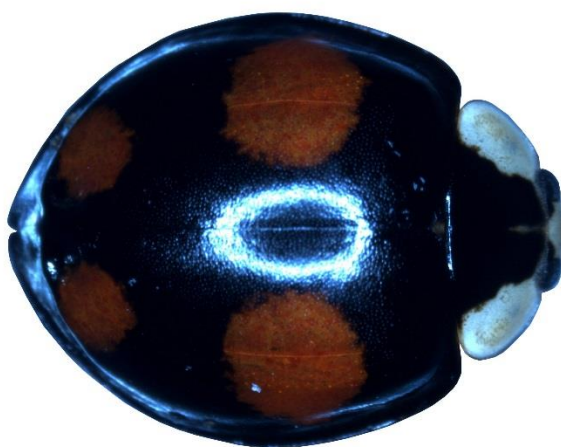
Melanické formy („černé s červenými puntíky“) jsou (seřazeny sestupně podle frekvence v evropské invazní populaci): *spectabilis*, *conspicua* a vzácná nominální *axyridis*. Poslední jmenovaná forma je velmi běžná v západní části původního areálu, ale v ČR byla k roku 2014 zaznamenána pouze u šesti jedinců z 50 000 prohlížených (Nedvěd, 2014). Forma *axyridis* má na každé krovce šest okrouhlých červených skvrn na černém pozadí (Obr. 2). Zbývající dvě formy mají jednu (*conspicua*) a dvě (*spectabilis*) červené skvrny na každé krovce (Obr. 3; Obr. 4). Vyskytují se ve východní části původního areálu, zvláště pak v Japonsku. Ve východní části areálu jsou patrné subpopulace (východosibiřská, japonská, čínská), které se od sebe liší právě relativními frekvencemi jedinců *succinea*, *spectabilis*, *conspicua* a dalších vzácnějších forem (Dobzhansky, 1933). V Evropě lze ještě potkat formu *equicolor*, která má přední polovinu krovek červenou a zadní černou. Je ale všude tak vzácná (Nedvěd, 2014), že v kontextu této práce skoro nestojí za zmínku.



Obrázek 2: *Harmonia axyridis* f. *axyridis*; ($\beta = 4,91$ mm; viz Obr. 10); vlastní fotografie.



Obrázek 3: *Harmonia axyridis* f. *conspicua*; ($\beta = 5,38$ mm; viz Obr. 10); vlastní fotografie.



Obrázek 4: *Harmonia axyridis* f. *spectabilis*; ($\beta = 5,60$ mm; viz Obr. 10); vlastní fotografie.

1.4.2 Dědičnost zbarvení

Barevné formy jsou řízeny patnácti alelami jediného multialelického lokusu (Komai, 1950; Tan, 1946) s jasně danou hierarchií dominance (dominantní – recesivní: *conspicua* > *spectabilis* > *axyridis* > *succinea*). Tan (1946) formuloval *hypotézu mozaikové dědičnosti*, která předpokládá, že u heterozygota se na krovkách vyvine černé zbarvení všude tam, kde jsou černí odpovídající homozygoti. Například jedinec nesoucí alely *conspicua* a *spectabilis* bude mít fenotyp *conspicua*, protože ta je černá i v oblasti zadních dvou skvrn u *spectabilis*. Díky tomu lze někdy rozpoznat křížence, určit otcovství jedinců ve snůšce po páření samice s více samci, selektovat čisté (homozygotní) linie a vytvářet vzácné barevné formy – třeba pro zjištění rychlosti disperze v různých antropogenních prostředích (Nedvěd, 2014).

1.4.3 Termální melanismus

Fenotyp jedince vzniká interakcí jeho genotypu a prostředí, ve kterém se vyvíjí. Fenotypová plasticita je změna v chování, morfologii nebo fyziologii jedince způsobená prostředím (Price *et al.*, 2003). Realizaci jediného genotypu napříč škálou různých prostředí (odpověď genotypu na změny v prostředí) popisuje norma reakce (Woltereck, 1909 *ex* Michie *et al.*, 2010). Diverzita v prostředí se jedinci mohou přizpůsobit buď lokální adaptací, nebo fenotypovou plasticitou, přičemž výhodnost plasticity závisí na škále, v jaké je prostředí proměnlivé. Pokud je prostředí heterogenní, ale na příliš velké škále (větší než je disperzní schopnost sluníček), budou jedinci čelit stále stejným podmínkám a adaptují se na ně (Michie *et al.*, 2010).

Hypotéza termálního melanismu u ektotermních živočichů navrhuje, že tmavší jedinci jsou při nízkých teplotách zvýhodněni oproti světlejším, protože se slunečními paprsky rychleji vyhřejí (Trullas *et al.*, 2007). U sluníčkovitých brouků, kteří měli krovky z velké části černé, oproti světlejším jedincům pod přímým osvětlením opravdu došlo k většímu navýšení tělesné teploty (Stewart & Dixon, 1989). *H. axyridis* vykazuje dva druhy termálního melanismu: jednak geneticky podmíněný, jednak fyziologický (*sensu* Michie *et al.*, 2010; Nedvěd, 2011).

Geneticky podmíněný termální melanismus spočívá v tom, že sluníčko může na geografickou heterogenitu prostředí v klimatu odpovídat změnami v relativní frekvenci jednotlivých forem, tedy lokální adaptací. Geografická proměnlivost se v počátečních populačně-genetických studiích opravdu zdála být spojená s klimatem, přičemž nemelanické formy byly obvyklé v teplých aridních oblastech, zatímco melanické v oblastech vlhkých a chladnějších (Dobzhansky, 1933). V Japonsku byl však zjištěn frekvenční gradient naprosto neodpovídající popsánému scénáři (Komai *et al.*, 1950).

Fyziologický termální melanismus je jev, kdy se zbarvení jedince během vývoje přizpůsobí teplotním podmínkám prostředí (Nedvěd, 2011). U sluníčka východního se projevuje pouze u formy *succinea*, u které rozsah černého zbarvení krovek negativně koreluje s teplotou zažitou při preimaginálním vývoji (Michie *et al.*, 2010). Při teplotě vývoje okolo 30°C jsou krovky téměř čistě červenooranžové, při teplotách 25 – 30°C vzniká malý počet drobných černých teček, při nižších teplotách se tečky zvětšují, až splývají v černý vzor se zbytkovými červenými políčky (Nedvěd, 2014). V reakčních normách existuje genetická proměnlivost – různé linie *H. axyridis* odpovídají na změny teploty různým způsobem, což znamená, že proměnlivá prostředí mohou indukovat

genetické i fenotypově plastické adaptace (Michie *et al.*, 2010). Fenotypová plasticita je výhodná zvláště tehdy, pokud je změna v prostředí predikovatelná (Via, 1995). Neadaptivnější by mělo být přizpůsobení se později v preimaginálním vývoji, protože čím recentnější podmínky jedinec reflektuje, s tím větší pravděpodobností se může „zrovna trefit“ (Michie *et al.*, 2010). A opravdu, pokud se larvy prvního, druhého či třetího instaru krátce vystaví zvýšené teplotě, fenotyp není ovlivněn. Pokud však zvýšenou teplotu zažijí pozdější vývojová stádia (4. instar nebo kukla), dojde ke snížení melanizovanosti krovek u imag (Knapp & Nedvěd, 2013). Kříženec čistých homozygotů forem *succinea* a *conspicua* by měl mít podle konceptu mozaikové dědičnosti v červených okénkách černé skvrny, což se ale projeví pouze tehdy, pokud se vyvíjel za nízké teploty. Při vývoji za vysoké teploty nebude jeho fenotyp odlišitelný od čistého homozygota formy *conspicua*, proto je v laboratoři nutné nechávat slunéčka líhnout v nízké teplotě (Nedvěd, 2014).

Dospělé slunéčko východní formy *succinea* má zbarvení determinované již při líhnutí se z kukly. Během několika hodin se kutikula vybarví a vzor se pak již nemění, i když dojde ke změnám teploty. Dospělci ale dokáží regulovat tělesnou teplotu chováním – mohou se schovat do stínu nebo vyhřívat na slunci. Jenže kukly jsou pevně přitmelené k podkladu a s okolím nic nezmůžou, a tak je pro ně zbarvení mnohem zásadnější než pro mobilní imaga. Rozsah černého zbarvení na kukle je proto nepřímě úměrný teplotě, které byl vystaven čtvrtý larvální instar (prepupa). Důležité je, že to platí pro všechny kukly bez ohledu na barevnou formu a že kukly formy *succinea* nemají termální paměť. Pokud bude oranžové kukle, jejíž čtvrtý larvální instar zažil vysokou teplotu, zima, vylíhne se z ní černý jedinec (Nedvěd, 2011).

1.4.4 Zbarvení štítu

Melanické formy (*axyridis*, *conspicua*, *spectabilis*) mají na štítu černý lichoběžník ohraničený bílými okraji zasahujícími do jedné čtvrtiny štítu (Obr. 2; Nedvěd, 2015). Forma *succinea* je v pigmentaci štítu mírně proměnlivá, má na štítu 4 – 5 jednotlivých nebo slitých černých skvrn ve tvaru písmene M (Obr. 1). Rozsah černého zbarvení štítu je pozitivně korelován s rozsahem černého zbarvení krovek a černá frakce štítu je u samic tmavší a rozsáhlejší než u samců (Bezzarides & Loofbourrow, 2014). Zdá se tedy, že zbarvení štítu u formy *succinea* rovněž podléhá fyziologickému termálnímu melanismu.

1.4.5 Ontogenetické mechanismy tvorby černého vzoru

Krovky slunéčka východního jsou pigmentovány černým melaninem, červenými karotenoidy a pteriny (Bezzarides *et al.*, 2007). Červená barviva se ukládají v buňkách pokožky a melanin do kutikuly nad pokožkou (Nedvěd, 2011; Wittkopp & Beldade, 2009). O tom, zda příslušná část kutikuly bude zbarvena černě, se rozhoduje na buněčné úrovni dvěma způsoby: poziční informací nebo působením morfogenů (Nedvěd, 2011).

Buňky pokožky v případě prvního způsobu vyhodnotí svou pozici na krovkách, podle toho tvoří melanin a ukládají jej do kutikuly nad sebou. To je případ melanických forem (Nedvěd, 2011).

Druhý způsob černání kutikuly řídí morfogeny – neznámé signální molekuly předávané z buňky do buňky od melanizačních center. V melanizačních centrech sídlí buňky, které kladně vyhodnotí svou pozici na krovce, ale kromě toho, že ukládají do

kutikuly melanin, posílají do svého okolí morfogeny. Buňky, do nichž se dostane nadlimitní množství morfogenu, začnou rovněž produkovat melanin. Tento fenomén je typický pro formu *succinea*. Jedinci, kteří se vyvíjeli ve vysoké teplotě, mají nižší aktivitu melanizačních center (= expresi příslušného genu nebo aktivitu vzniklého enzymu, případně export signálu do dalších buněk). Při vývoji za nízké teploty (kdy se hodí být černý) melanizační centra zvyšují svou aktivitu a tvoří černé tečky, které se mohou dokonce slévat v kontinuální kresbu (Obr. 12; Nedvěd, 2011).

1.4.6 Causa karotenoidy

Karotenoidy se poprvé objevily u archebakterií, kterým sloužily na vyztužování buněčných membrán. K této funkci mají jejich dlouhé molekuly velmi neohebnou základní kostru z deseti až jedenácti konjugovaných C=C vazeb v *trans*-konfiguraci, což je délka odpovídající tloušťce hydrofobní části membrány, kterou penetrují jako jakési „molekulární nýty“. U některých hub a živočichů si karotenoidy svou membránovyztužovací funkci zachovaly. Obecná struktura molekul karotenoidů, která původně plnila mechanickou funkci v membránách, se však ukázala být skvěle preadaptována ke spoustě jiných účelů. Systém konjugovaných dvojných vazeb absorbuje viditelné světlo přesně v mezeře chlorofylové absorpce, takže slouží jako přídavné světlosběrné pigmenty u zelených rostlin. Jedinečné uspořádání nejenže umožňuje přenos energie z excitovaného karotenoidu na chlorofyl ve světlosběrných komplexech, ale i z tripletního excitovaného chlorofylu nebo singletního kyslíku na karotenoid, což je zásadní fotoprotektivní mechanismus v reakčních fotosyntetických centrech. Dále se podílejí na tvorbě barevných vzorů zvířat a rostlin, u některých bezobratlých chrání vaječné proteiny před proteázami a mohou sloužit jako antioxidanty. Příímý karotenoidový derivát – retinal – je u živočichů součástí zrakového pigmentu rhodopsinu, další deriváty: kyselina retinová u živočichů a kyselina abscisová u rostlin slouží jako hormony (Vershinin, 1999).

O karotenoidech se mělo dlouho všeobecně za to, že je dokáží syntetizovat *de novo* pouze rostliny, mikroorganismy a houby, zatímco živočichové je musejí získávat z potravy (Needham, 1974). Britton *et al.* (1977) zjistili u *Coccinella septempunctata* Linnaeus, 1758 karotenoidy, které nemohly pocházet z rostlin, na nichž sají mšice, jimiž se slunéčko živí. Došli k závěru, že karotenoidy pravděpodobně pocházely od nějaké symbiotické bakterie přímo ze slunéčka, protože jejich struktura napovídala, že nebyly z potravy. Poté se dlouho nic nedělo, až konečně Moran & Jarvik (2010) prokázali, že v genomu mšice *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776) se nacházejí geny pro různé enzymy na *de novo* biosyntézu karotenoidů. Fylogenetická analýza ukázala, že došlo k horizontálnímu genovému transferu zmíněných genů od hub, následné integraci do genomu mšic a jejich duplikaci. Později byl prokázán genový transfer podobných genů od hub do svlušek a bejlomerek (Altincicek *et al.*, 2012; Cobbs *et al.*, 2013). Molice dostávají karotenoidy od endosymbiotických gama proteobakterií (Sloan & Moran, 2012).

Krovky *H. axyridis* obsahují asi deset různých karotenoidů, naprostou většinu z nich (72 %) představují: α -karoten, β -karoten a lykopen. Červenost krovek měřená v grafickém programu pozitivně koreluje s celkovou koncentrací karotenoidů v krovkách (Bezzarides *et al.*, 2007). Multivoltinní životní cyklus a dlouhá délka života dospělce u *H. axyridis* způsobují značný překryv generací (Ceryngier & Twardowska, 2013). Již Hodek (1973) píše, že krovky slunéček získávají po vylíhnutí svůj obvyklý vzhled

postupně, přičemž většina změn se dostaví v řádu hodin, ale červená barva zůstává vybledlá po mnoho týdnů až měsíců. Proto je možné rozlišit jedince, kteří přezimovali, od těch nově vylíhlých. Obsah karotenoidů v krovkách tedy nejspíše může vypovídat o stáří jedince, což ovšem dosavadní studie zabývající se migrujícími nebo přezimujícími sluněčky východními vesměs nereflektovaly (např. Nalepa *et al.*, 1996; Nedvědová *et al.*, 2012; Pons *et al.*, 2015; ALE: Osawa & Nishida, 1992; *ad Adalia bipunctata*: Brakefield, 1984). Detailní porozumění překrývání generací je však mimo jiné krucální pro studium dynamiky pohlavně přenosných chorob sluněček a hmyzu obecně (Ceryngier & Twardowska, 2013; Knell & Webberley, 2004).

Vliv potravy larev na barvu dospělce *H. axyridis* zkoumal Grill & Moore (1997). Pylová strava *ad libitum* vyústila ve světlejší krovky, kratší vývoj a větší velikost dospělce. Oproti tomu jedinci limitovaně krmení mšicemi byli červenější. Grill & Moore (1998) navrhuje, že nejpříznivější prostředí pro tvorbu sytě červeného zbarvení zároveň nemusí být vhodné pro expresi jiných životních znaků, zvláště pak ve stresových podmínkách. Mšice si však mohou samy syntetizovat karotenoidy (Moran & Jarvik, 2010) a jedinci (jakkoli limitovaně) krmení mšicemi tedy přirozeně byli červenější.

O roli karotenoidů v aposematické signalizaci a jejich případné věrohodnosti u sluněček pojednávám níže.

1.4.7 Barevné formy a pohlavní výběr

Osawa & Nishida (1992) ve středním Japonsku zkoumali sezónní změny v zastoupení barevných forem *H. axyridis* v kontextu nenáhodného páření. Zastoupení nemelanických jedinců od jara do léta ztelně narostlo kvůli jejich častějšímu páření mezi ostatními formami jarní generace. V laboratorních experimentech byli na jaře upřednostňováni nemelaničtí samci, zatímco v létě byli úspěšnější samci melaničtí. Sezónní změny v zastoupení barevných forem byly zapříčiněny nenáhodným pářením, přičemž tento pohlavní výběr byl markantnější ze strany samic. Samci formy *conspicua* uměle přemalovaní na formu *succinea* měli výrazně zvýšený úspěch při páření. I když je barevný vzor na krovkách pro mezipohlavní selekci ze strany samic velmi významný, nelze opomíjet různé behaviorální a chemické faktory, protože frekvence páření formy *succinea* přemalované na formu *conspicua* se nezměnila.

Z Japonska je rovněž známo, že v rámci nemelanických samců byli pářící se samci signifikantně větší než samci solitérní. Mezi solitérními a kopulujícími melanickými samci nebyli ve velikosti průkazné rozdíly. Na úspěch při páření mají tedy vliv barevná forma i tělesná velikost. Různě velcí samci mají výhody v páření determinované barevným vzorem na krovkách (Ueno *et al.*, 1998).

V Číně nemelanické fenotypy převažovaly nad melanickými 5:1 na podzim, zatímco na jaře byla frekvence obou stejná. Melanismus je tedy výhodný v zimě a nákladný v létě. Samice prováděly mezipohlavní selekci buďto otevřeně přímým odmítáním některých samčích fenotypů, nebo krypticky udržením si vajíček po páření s „nepěkným“ samcem delší dobu (údajně aby nahradily jeho sperma; Wang *et al.*, 2009). Před použitím spermatu melanických samců čekaly samice déle, přičemž melanické samice se zpožďovaly více než nemelanické. Melaničtí samci trávili *in copula* více času s nemelanickými než s melanickými samicemi (Su *et al.*, 2013). Selekcce proto probíhá i ze strany samců.

1.5 Zbarvení v kontextu aposematismu

1.5.1 Význam a původ zbarvení slunéček

Hlavním záměrem autorů studujících vnitrodruhový barevný polymorfismus bývá vysvětlit jeho význam a původ. Protože jsou však barevný vzor, tělesná velikost a toxicita mezi slunéčkovitými brouky značně různé, je pravděpodobné, že vysvětlení *nebude pro všechny stejné*. Světlé a melanické formy mají u odlišných druhů odlišný význam. Určité barevné vzory slouží jako varovné u jedovatých druhů a jejich mimiků (napodobitelů). Kryptické zbarvení zase může být adaptace na okolní prostředí, signál pro partnera nebo prostředek k termoregulaci (Sloggett & Honěk, 2012).

1.5.2 Aposematismus

Aposematismus je jev, kdy organismus svým varovným zbarvením demonstruje potenciálnímu predátorovi nepoživatelnost (Guilford, 1988). Byl popsán E. B. Poultonem (1890 *ex* Komárek, 2004). Slunéčka jsou typickým příkladem aposematismu, protože vykazují nápadné zbarvení a při ohrožení vylučují odpudivé obranné látky (Majerus, 1994 *ex* Jan Pettersson, Hodek 2012).

1.5.3 Müllerovské mimikry

Jako jev zodpovídající za zachování barevného polymorfismu byly mimo jiné navrženy Müllerovské mimikry. Druhy, jejichž dospělci mají křiklavě žlutý či červený povrch, jsou považovány za aposematické, tedy předcházejí útoku ze strany vizuálně se orientujících predátorů, obvykle ptáků. Odpudivost je důsledkem dřívější negativní zkušenosti predátora s nechutnou kořistí. Několik druhů podobného zbarvení pak tvoří Müllerovský komplex, ve kterém predátor jednotlivé druhy nerozlišuje. Negativní zkušenost s prvním útokem na člena komplexu se zobecní a všichni členové komplexu se do budoucna stanou chráněnými (Sloggett & Honěk, 2012). Komárek (2004) se však domnívá, že čeleď Coccinellidae je téměř jen aposematická bez mimetismu.

1.5.4 Chemická obrana a reflexní krvácení

H. axyridis je jako většina slunéček chráněna alkaloidy (Sloggett *et al.*, 2011), a to: 3-hydroxypiperidin-2-onem a harmoninem, který je také známý jako (17R,9Z)-1,17-diaminooctadec-9-en (Alam *et al.*, 2002). Kromě alkaloidů má v hemolymfě nechutně zapáchající 2-alkyl-3-methoxypyraziny, a to například: 2,5-dimethyl-3-methoxypyrazin (DMMP); 2-isopropyl-3-methoxypyrazin (IPMP); 2-sek-butyl-3-methoxypyrazin (SBMP); 2-isobutyl-3-methoxypyrazin (IBMP; Cudjoe *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2007).

Při ohrožení vypouští slunéčko kapky hemolymfy – dospělec z tibiofemorálních kloubů (= kolen), larva z dorzálních žláz na zadečku (Pettersson, 2012). Tomuto jevu se říká reflexní krvácení.

Chemická obrana *H. axyridis* je i v porovnání s jinými slunéčkami zvláště silná. Extrakt z celého těla *H. axyridis* byl pro mladé hrotnatky (Cladocera: *Daphnia magna* Straus, 1820) mnohem toxičtější než extrakt ze slunéček *Coccinella septempunctata* či *Adalia bipunctata* (Nedvěd *et al.*, 2010). Navíc při srovnání nechutnosti extraktů z osmi druhů slunéček pro mravence *Lasius niger* (Linnaeus, 1758) byla jako „nechutnější“ než

H. axyridis zjištěna jen *Coccinella septempunctata* (Nedvěd *et al.*, 2010). Značná toxicita a nechutnost pro ostatní členovce může sluněčkům východním poskytovat ekologické výhody.

1.5.5 Náklady na produkci aposematických sloučenin, věrohodnost signalizace

Za aposematické sloučeniny zde považují dvě skupiny látek: karotenoidy, které se u *H. axyridis* podílejí na zbarvení (Bezzarides *et al.*, 2007), a alkaloidy s methoxypyraziny, které slouží k chemické obraně (Alam *et al.*, 2002; Cudjoe *et al.*, 2005).

Produkce obranných sloučenin je pro sluněčko nákladná (Pettersson, 2012). Larvy, které byly nuceny reflexně krvácet, se vyvíjely déle a v dospělosti měly oproti kontrolním jedincům menší velikost a nižší hmotnost (Grill & Moore, 1998; Sato *et al.*, 2009). To však mohlo být způsobeno i ztrátou bílkovin obsažených v hemolymfě.

Vnitrodruhová proměnlivost v obsahu harmoninu byla zdokumentována u dospělců i vajíček *H. axyridis* (Bezzarides *et al.*, 2007; Kajita *et al.*, 2010). Bezzarides *et al.* (2007) zjistili, že jedinci formy *succinea* s větším podílem červené na krovkách měli větší množství harmoninu v těle. Navrhují, že barevný vzor může sloužit jako „věrohodný“ ukazatel nepoživatelnosti. Mezi koncentrací karotenoidů v krovkách a obsahem harmoninu nenalezli žádný vztah. Posléze bylo potvrzeno, že méně melanizovaní jedinci mají vskutku více harmoninu než ostatní, včetně dalších barevných forem (Fischer *et al.*, 2010 *ex* Sloggett *et al.*, 2011). Laboratorní experimenty s křížáky nepřinesly žádný důkaz o tom, že by silně melanizovaní jedinci nebo melanické formy byli méně chráněni před predací (Sloggett, 2010). Zvýšený obsah harmoninu u beztečných jedinců formy *succinea* pravděpodobně není předmětem selekce ani ze strany ptačího predátora (Průchová *et al.*, 2014). Sloggett (2010) poznamenává, že k plné interpretaci výsledků podobných studií chybí poznatky o druhém alkaloidu *H. axyridis* – 3-hydroxypiperidin-2-onu.

Cai *et al.* (2007) zjistili, že světlejší („yellow“) jedinci formy *succinea* měli nižší průměrnou koncentraci tří methoxypyrazinů (IPMP, SBMP, IBMP) než tmavší („orange“) jedinci. Kögel *et al.* (2012) zaznamenali ve dvou ze tří potravních režimů u čistě oranžových jedinců formy *succinea* nižší obsah IPMP než u tečkovaných jedinců.

Jedinci *Coccinella septempunctata*, kteří byli v larválním stádiu bohatě krmeni mšicemi, měli oproti málo krmeným jedincům v dospělosti vyšší hladinu alkaloidu prekocinellinu a byli červenější s vyšší koncentrací karotenoidů v krovkách. Rozdíl ve zbarvení krovek mezi málo a bohatě krmenými jedinci byl rozpoznatelný ptačím predátorem (špačkem). Potravní režim neměl vliv na hladinu dalšího alkaloidu, kokcinellinu. Koncentrace karotenoidů v krovkách pozitivně korelovala s celkovým obsahem prekocinellinu u obou potravních režimů i pohlaví. Obsah karotenoidů s hladinou kokcinellinu koreloval u samic pozitivně, u samců negativně. Velikost černých teček s hladinou kokcinellinu korelovala pozitivně u málo krmených, negativně u bohatě krmených jedinců. Mezi složkami aposematického signálu tedy pravděpodobně existují fyziologické spojitosti, které jsou modulovány zdroji (potravou), a ovlivňují věrohodnost signalizace (Blount *et al.*, 2012). Zmíněná studie navíc ukazuje, že různé alkaloidy jednoho sluněčka mohou být odlišně korelovány se zbarvením krovek či ovlivněny dostupností zdrojů. To podporuje závěry Sloggetta (2010) o nutnosti studia i druhého alkaloidu *H. axyridis* (3-hydroxypiperidin-2-onu).

1.5.6 Interakce s ptačím predátorem

Dolenská *et al.* (2009) porovnávali reakce sýkory koňadry (*Parus major* Linnaeus, 1758) na čtyři různě zbarvené druhy slunéček a dvě umělé modifikace slunéčka *Coccinella septempunctata* (s nahnědo nabarvenými či úplně odstraněnými krovkami). Slunéčka s přirozeně tečkovanými krovkami byla napadána méně často než slunéčka beztečná. Slunéčka s odstraněnými krovkami byla napadána mnohem častěji než jakákoli jiná, u kterých nebyl porušen celkový vzhled (tvar těla). V procesu rozpoznávání slunéčka ptačím predátorem je tedy důležitý jak tečkovaný vzor, tak i celkový vzhled. Pokusy s naivními (v zajetí vycištěnými) sýkorami ukázaly vrozenou averzi vůči *Coccinella septempunctata*.

Porovnávání různých druhů slunéček může být zkreslené jejich odlišnostmi ve velikosti, chemické obraně atd. Průchová *et al.* (2014) konfrontovali sýkory koňadry s *H. axyridis*, a to s přirozeně tečkovanými, čistě oranžovými nebo uměle nabarvenými jedinci formy *succinea*. Sýkory se intenzivně vyhýbaly všem červeno-černým jedincům, hnědě nabarvení jedinci byli napadáni častěji. Jedinci nabarvení hnědě a černými tečkami byli chráněni nepatrně lépe než jedinci pouze hnědí. Tečky tedy mají v ochraně slunéčka určitý význam, nicméně červeno-černé zbarvení představuje hlavní složku vizuálního signálu.

Vrabci polní (*Passer montanus* (Linnaeus, 1758)) s *H. axyridis* interagují poněkud kontraintuitivně. Jedinci odchycení na zimních krmítkách slunéčka *běžně* napadali a požírali. Zároveň se nikdy u žádného vrabce, který slunéčko pozřel, neprojevovala sebemenší nevolnost nebo náznak intoxikace. Naivní vrabci vybraní z budek, ale i v přírodě odchycení mladí vrabci, slunéčka napadali, odmítali je však pozřít – chemická obrana na ně měla vliv. Dospělí jedinci odchycení v letních měsících váhali dokonce s útokem na slunéčko. Vrabci tedy napadají a požívají slunéčka, pokud: (i) mají omezenou potravní nabídku, (ii) nemají recentní zkušenost s aposematickou kořistí, (iii) postrádají v potravě živočišnou složku. Fyziologicky jsou pravděpodobně připraveni na příjem toxického slunéčka jako zdroje potravy a skutečně jej pozřou přesto, že ho dobře znají (Veselý *et al.*, 2016).

1.6 Přírodní nepřátelé a biologický boj

Harmonia axyridis má mnoho přírodních nepřátel, v širším smyslu tedy: „organismů, které zabíjejí, snižují reprodukční potenciál, či jinak negativně ovlivňují početnost jiného organismu“ (Flint & Dreistadt, 1998). Jsou to například: ptáci, lumčík, mouchy, roztoč, hlístice, houby nebo bakterie zabíjející samce (Roy *et al.*, 2011; Veselý *et al.*, 2016). Zde se věnuji přírodním nepřátelům, kteří bezprostředně souvisí s mou prací: parazitické hlístici a houbě, bakteriím zabíjejícím samce. Pro podrobnosti o dalších nepřátelích viz Kenis *et al.* (2008) nebo Roy *et al.* (2011).

Biologický boj je „environmentálně stálý a efektivní prostředek redukování či umírňování škůdců a jejich dopadů prostřednictvím přírodních nepřátel“ (Biological Control, 2015). Může být použit i proti *H. axyridis*, ale měl by být specifický a bez vedlejších účinků na ostatní druhy slunéček, protože ta jsou obecně považována za užitečný hmyz (Kenis *et al.*, 2007).

1.6.1 Významné teorie biologie invazních druhů

Hypotéza úniku před nepřáteli (*the enemy release hypothesis* – ERH) je teoretický koncept vysvětlující úspěch invazních druhů (Roy *et al.*, 2011; Wolfe, 2002). Tato hypotéza predikuje, že když se nějaký druh dostane do nového prostředí, kde není původní, přestanou ho ovlivňovat přírodní nepřátelé, a tak dojde k navýšení jeho početnosti a schopnosti se šířit. Doslova tedy „uteče“ před nepřáteli. ERH samozřejmě mlčky předpokládá, že přírodní nepřátelé opravdu *dokáží* regulovat populace svých hostitelských druhů a navíc mají větší vliv na druhy původní než na nepůvodní přistěhovalce, díky čemuž dochází u přistěhovalců k populačnímu nárůstu. Colautti *et al.* (2004) rozlišují dva způsoby, kterými může nějaký druh „utéct“ svým nepřítelům. První nastává, když je hostitelský druh silně regulován svými nepřáteli, tedy je málo odolný a velmi zranitelný. V takovém případě ztráta nepřátel během procesu invaze vyústí ve zvýšené přežívání, plodnost nebo tělesnou hmotnost či jiné demografické faktory. Jedná se o únik regulatorní (*regulatory release*). Pokud byl hostitelský druh proti nepřítelům dobře chráněn, jejich ztráta by na jeho populaci měla zanedbatelný vliv. Jestli však byla obrana nějakým způsobem nákladná, mohlo dojít k nepřímému úniku tím, že limitované zdroje používané na obranu proti nepřítelům byly re-alokovány jinam (třeba do populačního růstu) – to je únik kompenzační (*compensatory release*). Tento druhý jev je od rostlin známý také jako hypotéza evoluce zvýšené konkurenční schopnosti (*the evolution of increased competitive ability hypothesis* – EICA; Blossey & Nötzold, 1995).

1.6.2 Bakterie zabíjející samce

U bezobratlých jsou běžné vertikálně přenosné bakterie manipulující reprodukcí hostitele. Ze čtyř známých způsobů manipulace hmyzu bakteriemi jsou tři (cytoplazmatická inkompatibilita, feminizace a indukce partenogeneze) způsobovány pouze rodem *Wolbachia*. Naproti tomu čtvrtou strategií, zabíjení samců, dokáže široká plejáda bakterií (Majerus *et al.*, 1999).

Když se taková cytoplazmatická bakterie vyskytne v samci, je to pro ni slepá evoluční ulička, protože do spermií se prostě nevejde, a tak se nemůže vertikálně přenést na další generaci. Namísto toho může své fitness zvýšit tím, že samce zabije, čímž zvýhodní své klony v samicích (Ceryngier *et al.*, 2012; Hurst & Majerus, 1993). U slunéček bakterie zabíjejí samce na počátku embryonálního vývoje, čímž re-alokují (přesměrují) zdroje, které by využili samci, k jejich samičím sestrám (Majerus, 2003 *ex* Ceryngier *et al.*, 2012). Samice získají výhodu v odstranění konkurentů a ve zdroji potravy v podobě mrtvých samčích embryí. Poměr pohlaví je z tohoto důvodu u *H. axyridis* často vychýlen ve prospěch samic (Majerus *et al.*, 1998). Pojít mrtvé bratry je výhodnější pro potravně specializované druhy slunéček, protože jejich kořist je hůře dostupná, a tak se jim hodí se po vylíhnutí před cestou najíst (Noryiuki *et al.*, 2014). *H. axyridis* je vhodný hostitel bakterií zabíjejících samce, protože je afidofágní, snáší semknuté snůšky a je kanibal sourozeneckých vajíček (Majerus *et al.*, 1999).

1.6.3 Hlístice *Parasitylenchus bifurcatus*

Napadení *H. axyridis* hlísticí *Parasitylenchus sp.* poprvé zaznamenali Harding *et al.* (2011) v Dánsku na podzim roku 2009. Prevalence kolísala mezi 2 a 33 %. Dospělé i juvenilní hlístice se společně vyskytovaly v tělní dutině (hémocelu) samců i samic. Později byla tato hlístice popsána jako nový druh *Parasitylenchus bifurcatus* (Poinar &

Steenberg, 2012). Na podzim roku 2010 byla prevalence v Dánsku 35 % (Poinar & Steenberg, 2012). Napadení jedinci měli ztenčené tukové zásoby a částečně atrofované pohlavní orgány, což je jeden z důvodů, proč byl *P. bifurcatus* navržen jako možný prostředek biologického boje proti *H. axyridis*. *P. bifurcatus* je zatím známý pouze z Evropy (ČR, Dánsko, Nizozemí, Polsko), i když blíže nedeterminované hlístice byly zaznamenány v Německu a USA (Haelewaters *et al.*, 2016).

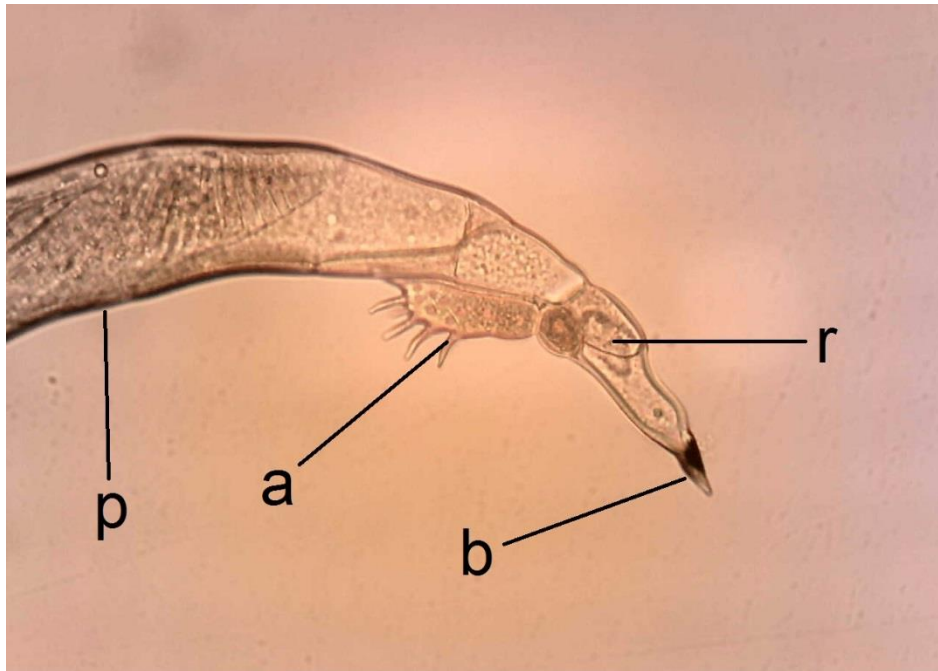
1.6.4 Houba *Hesperomyces virescens*

Řád Laboulbeniales je vysoce specializovaná skupina vřeckovýtrusných hub (Ascomycota: Laboulbeniomycetes) obligátně vázaná na členovce (Haelewaters *et al.*, 2015). Byla pojmenována na počest francouzského entomologa Josefa Alexandra Laboulbèna (Weir & Beakes, 1995), který ji pozoroval jako první, a to spolu s Augustem Rougetem ve čtyřicátých letech devatenáctého století (Haelewaters, 2012). Zpočátku byly tyto houby považovány za zvláštní výrůstky (chlupy) na povrchu členovců, nebo dokonce za parazitické červy. Systematicky je studoval až Roland Thaxter, profesor Harvardovy univerzity, v letech 1891 až 1932 (blíže viz Haelewaters *et al.*, 2015). Máca (2003) navrhl pro Laboulbeniales český název roztřepenky.

Fylogenetické analýzy DNA ukazují třídu Laboulbeniomycetes zahrnující řád Pyxidiophorales jako sesterskou k Sordariomycetes, kládu, který obsahuje saprofágy a patogeny živočichů, rostlin či hub, a jehož zástupci obecně tvoří peritécia (Schoch *et al.*, 2009; Weir & Blackwell, 2001).

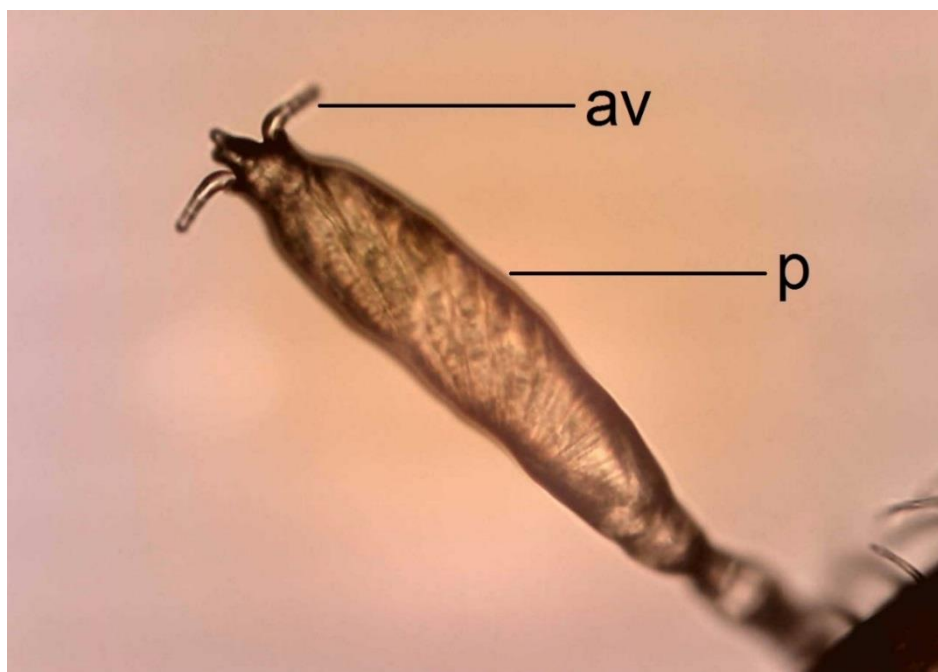
Laboulbeniales netvoří hyfy a jsou naprosto ojedinělé v tom, že vykazují determinovaný růst ústící v přesně definovanou stélku tvořenou určitým počtem buněk (Santamaría, 1998; Tavares 1985 *ex* Haelewaters 2015). Hlavnímu „válečku“ stélky se říká receptakulum (Weir & Beakes, 1995). Receptakulum je ukotveno v exoskeletu hostitele melanizovanou částí bazální buňky, obvykle nese peritécium a přívěšky s anteridii, která produkují spermácia (Haelewaters, 2015; Weir & Beakes, 1995). Celé stélce zde budu říkat plodnice.

Hesperomyces virescens popsal profesor Thaxter (1891) ze slunéčka *Chilocorus stigma* Say, 1835 (= *C. bivulnerus* Mulsant, 1850). Tato roztřepenka má 215-511 µm dlouhou žlutavě zelenou plodnici s 60-90 µm dlouhým trojbuněčným receptakulem (De Kesel, 2011). Je jednodomá (De Kesel, 2011), jinak řečeno hermafroditická, což preferují, protože patří do Opisthokonta stejně jako třeba já nebo nějaký hlemýžď (Baldauf, 1999).

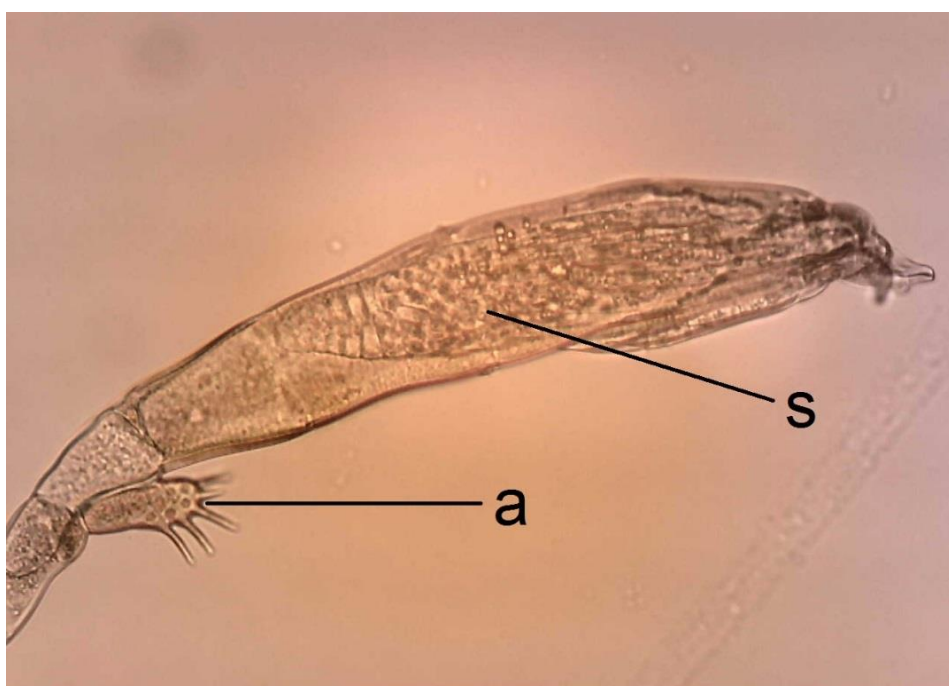


Obrázek 5: Spodní polovina plodnice *Hesperomyces virescens*; zvětšení: 10×20 ; zkratky: p – peritécium, a – antheridia, b – melanizovaná část bazální buňky, r – receptakulum; vlastní fotografie.

Celý životní cyklus *H. virescens* se odehrává na povrchu hostitele. Vývojovou morfologii detailně popsali Weir & Beakes (1996). Dvoubuněčné askospory jsou často vypouštěny v párech a při kontaktu s povrchem hostitele se prodlužují. Počáteční přilnutí pravděpodobně zajišťuje zduřelá část pochvy, která obklopuje špičku vrcholu větší buňky askospory. Tato špička dává vzniknout melanizované části bazální buňky (Obr. 5) – hlavnímu kotvicímu orgánu. Větší ze dvou buněk askospory se pak dělí a vytváří peritécium a trojbuněčné receptakulum. Z menší buňky se stávají anteridiální přívěsky. Jako jedna z mála Laboulbeniales vytváří *H. virescens* větvený haustoriální aparát rhizoidálního charakteru bez sept a penetruje do hémocelu hostitele. Po vytvoření anteridiálních výběžků vyrůstá poblíž na receptakulu trichogyn, který následně oplozují spermácia. Trichogyn se poté odlamuje a zůstává po něm jizva na narůstajícím peritéciu, v němž se tvoří vřevka s askosporami. Na vrcholu peritécia se formuje komplexní a jedinečný aparát s apikálními výběžky (Obr. 6), který nejspíš slouží jako „spoušť“ k vypuzování askospor.



Obrázek 6: Plodnice *Hesperomyces virescens* vyrůstající z končetiny slunéčka; zvětšení 10×20 ; zkratky: p – peritécium, av – apikální výběžky; vlastní fotografie.



Obrázek 7: Horní polovina plodnice *Hesperomyces virescens*; zvětšení: 10×20 ; zkratky: a – antheridia, s - askospory; vlastní fotografie.

Askospory (Obr. 7) nejsou trvanlivé, přežívají krátce, a proto se musí šířit přímým kontaktem hostitelů. Jejich přenos mezi různými druhy slunéček je málo častý, obvykle se přenáší jen mezi jedinci jednoho druhu (Cottrell & Riddick, 2012), což může být způsobeno tím, že na konkrétním druhu hostitelského slunéčka roste jen určitá linie *H. virescens*. Fylogenetická analýza založená na sekvencích ribozomální RNA skutečně odhalila kryptickou diverzitu v rámci *H. virescens* (Haelewaters & Pfister, 2015),

přestože dosud nebyla považována za příliš hostitelsky specifickou, protože celý komplex napadá poměrně široké spektrum slunéček po celém světě (Ceryngier & Twardowska, 2013).



Obrázek 8: *Harmonia axyridis* při kopulaci. Samec (nahore) patří k formě *succinea*, samice (dole) patří k formě *conspicua*. (Převzato z Nedvěda, 2014.)

H. virescens je považována za pohlavně přenosnou chorobu (*sexually transmitted disease* – STD). Teorie předpovídá, že distribuce plodnic takové houby by měla odrážet průběh kopulace hostitele (Whisler, 1968; Welch *et al.*, 2001). U slunéček samec při páření vylézá na samici, která se přidržuje podkladu (Obr. 8). Samci by tedy měli být napadení spíše ve ventroposteriorní oblasti (= na bříše), zatímco samice v dorzoposteriorní oblasti (= záda; Obr. 15; Welch *et al.*, 2001). Některé studie však zjistily četné odchylky od scénáře sexuálního přenosu, či ho dokonce zpochybňují (De Kesel, 2011; Nalepa & Weir, 2007).

H. virescens byla na *H. axyridis* poprvé zaznamenána v Severní Americe (Ohio) v létě 2002 (Garcés & Williams, 2004). Dnes je tato interakce známá z Afriky (JAR) i Evropy (Belgie, Chorvatsko, ČR, Maďarsko, Německo, Nizozemí, Polsko, Velká Británie, Slovensko), Jižní Ameriky (Argentina) a Kanady (Haelewaters *et al.*, 2016). Dodatečně byli prohlížením muzejních sbírek vystopováni napadení jedinci *H. axyridis* z původního areálu (čínská provincie Sečuán) sebrání v první polovině dvacátého století (Haelewaters *et al.*, 2014). V USA byl první napadený jedinec zaznamenán až 86 let po první introdukci *H. axyridis* do Severní Ameriky a 14 let po prvním úspěšném uchycení populace *H. axyridis* v Severní Americe (Haelewaters *et al.*, 2014). V Evropě se časová prodleva mezi uchycením slunéčka a objevením nákazy vyskytla rovněž, pravděpodobně tedy byli vysazováni zdraví jedinci *H. axyridis*, na které se houba přenesla z místních slunéček (Haelewaters *et al.*, 2016). *H. axyridis* se pro *H. virescens* stala hlavním hostitelem a nejspíše také rozšířila její areál do chladnějších lokalit na severu (Ceryngier & Twardowska, 2013). Popsané „znovunabytí“ parazita je trochu v rozporu s hypotézou úniku od nepřátel (ERH), *H. axyridis* však vykazuje mnoho vlastností, které ji pro *H. virescens* činí mimořádně vhodným hostitelem (Ceryngier & Twardowska, 2013).

Jmenovitě je multivoltinní (Bazocchi *et al.*, 2004; Katsoyannos *et al.*, 1997), dlouhověká (Koch *et al.*, 2003), promiskuitní (Osawa, 1994), přezimuje ve velkých agregacích (Hodek, 2012) a její generace se překrývají (Ceryngier & Twardowska, 2013).

Laboulbeniales byly tradičně považovány za celkem neškodné komenzály (Weir & Beakes, 1995). V citrusových sadech v Izraeli bylo napadeno 95 % jedinců *Chilocorus bipustulatus* houbou *H. virescens* a byla zaznamenána brzká úmrtnost napadených jedinců, přičemž Kamburov *et al.* (1967) dramatický letní pokles početnosti slunéčka přičetli na vrub ektoparazita. Applebaum *et al.* (1971) nenašli pro takové vysvětlení žádnou podporu, v jednom ze zkoumaných sadů byla dokonce v období kritického poklesu populační hustoty užitečného slunéčka incidence *H. virescens* blízka nule. Jako příčinu poklesu navrhli nedostatek kořisti. Kehat *et al.* (1970) prokázali sníženou fekunditu a reprodukční aktivitu samic letní generace a rovněž zpochybnili vliv *H. virescens*. V simulovaných zimních podmínkách bylo prokázáno nepatrně snížené přežívání *H. axyridis* infestovaných *H. virescens* (Riddick, 2010). Nalepa & Weir (2007) navrhli sníženou frekvenci páření u samic s *H. virescens*, ale hned nato poznamenali, že jejich data se dala vysvětlit i prostou preferencí mladých samic před staršími bez ohledu na jejich napadenost. Rozdíly mezi zdravými a různě silně napadenými jedinci v hmotnosti nebyly v jejich studii signifikantní. Od jiných Laboulbeniales je známo, že mohou z hostitele odebírat vodu (Báthori *et al.*, 2015) nebo způsobovat zvýšené olamování tykadel, makadel či cerek švábů (Gemeno *et al.*, 2004).

1.6.5 Ko-infekce

Zásadní roli v biologickém boji proti *H. axyridis* by mohly hrát ko-infekce různými parazity. V simulovaných zimních podmínkách bylo prokázáno snížené přežívání jedinců ko-infestovaných roztočem *Coccipollipus hippodamiae* (McDaniel & Moril, 1969) (Acarina: Podapolipidae) a houbou *H. virescens*, jedinci infestovaní pouze roztočem sníženým přežíváním netrpěli (Riddick, 2010). Raak-van den Berg *et al.* (2014) v Nizozemí zjistili u jedné ze studovaných lokalit pozitivní korelaci mezi napadením *H. axyridis* houbou *H. virescens* a hlísticí *P. bifurcatus*.

Efektivita přenosu pohlavně přenosných chorob (*C. hippodamiae*, *H. virescens*) by byla značně navýšena rozšířením samce zabíjejících bakterií (Kenis *et al.*, 2007). U druhů, jejichž obě pohlaví jsou vysoce promiskuitní, jako je *H. axyridis*, se bude pohlavně přenosná choroba snáze šířit v populacích s převahou samic. Samci totiž budou „vzácným zbožím“ a při kontaktu s mnoha partnerkami snáze přenesou parazita (Majerus, 2003 *ex* Kenis *et al.*, 2007).

1.7 Užitečnost a škodlivost

1.7.1 Užitečnost

Harmonia axyridis byla vysazována především kvůli biologické ochraně rostlin (Koch, 2003). Nejpřirozenější prostředí jsou pro ni stromy, a tak likviduje škůdce v sadech, ale i ve sklenících, polních a zahradních kulturách a na okrasných rostlinách (Nedvěd, 2014). Odlišná fenologie a multivoltinismus *H. axyridis* oproti původním druhům našich slunéček umožňují efektivnější regulaci některých škůdců, jako jsou třeba mery (Nedvěd, 2014).

Alkaloid harmonin vykazuje širokospektré antimikrobiální a antiprotozoikální účinky. Působí na kvasinky *Candida albicans*; je stejně účinný proti senzitivním i multirezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* (MRSA); je zvláště efektivní na rychlorostoucí mykobakteria a *Mycobacterium tuberculosis*; při velmi nízkých koncentracích zabraňuje růstu původce malárie (*Plasmodium falciparum*) a předchází přenosu jeho pohlavních stádií do komára (Röhrich *et al.*, 2012). Navíc působí na ničivky *Leishmania major* (Nagel *et al.*, 2015). Bohužel však na linie motýlích a lidských buněk působí antiproliferačně a cytotoxicky, takže jeho použití jako antimalarika nebo antibiotika je zatím v nedohlednu (Alam *et al.*, 2002; Röhrich *et al.*, 2012). Recentní studie zdůrazňuje vývoj léčiv odvozených od struktury harmoninu (Nagel *et al.*, 2015). *In vitro* syntéza harmoninu je dobře zvládnutá, recentně byla dosažena i kompletní stereokontrola při syntéze jednotlivých izomerů (Abel *et al.*, 2016; Haulotte *et al.*, 2012; Nagel *et al.*, 2015; Philkhana *et al.*, 2014).

Harmonia axyridis je zvláštní v tom, že po aplikaci bakterií do těla nezvyší, ale naopak sníží produkci harmoninu, a začne tvořit antimikrobiální peptidy (Schmidtberg *et al.*, 2013). Ty vykazují aktivitu proti gram-negativním bakteriím a entomopatogenním houbám (Vilcinskas *et al.*, 2013).

1.7.2 Škodlivost

Dravá slunéčka obecně přijímají ráda v létě a na podzim sladkou náhradní potravu, která jim neumožňuje rozmnožování, ale je přeměněna na tukové zásoby (Nedvěd, 2014). Nedokáží prokousnout slupku sladkých plodů, a tak vyhledávají plody přezrálé či již narušené od vos nebo houbových chorob. Jedinci *H. axyridis* v USA zalézají do hroznů vinné révy a po zpracování jejich alkyl-methoxy-pyraziny negativně ovlivňují chuť a vůni výsledného vína (Pickering *et al.*, 2004). Některé enologické studie však neoznačují kontaminované víno za špatné, pouze za pozmeněné, a nevylučují záměrné přidávání sluníček do zpracovávané suroviny a výrobu speciálního sluníčkového vína (Nedvěd, 2014).

H. axyridis na podzim masivně naletuje a vniká do budov za účelem přezimování. Slunéčka silně zapáchají a při odstraňování vylučují hořkou žlutou hemolymfu, která trvale barví omítky a interiéry (Huelsman *et al.*, 2002; McCutcheon & Scott, 2001). Mohou lézt po automatických stínících stahovacích roletách na rodinných domech, které je při skládání drtí a zůstávají znečištěné (Obr. 9, L. Fiedler, nepublikováno). Slunéčka mohou kousat, kontaminovat jídlo a způsobovat kožní či dýchací alergické reakce (Huelsman *et al.*, 2001). První specifická alergie na *H. axyridis* byla zaznamenána roku 1998 (Goetz, 2008). Alergie se projevuje slzením očí, kopřivkou, otoky a astmatem. Hlavním alergenem je hemolymfa sluníček, zvláště pak proteiny Har 1 a Har 2. Je známý případ psa (kříženec vážící 22 kg), který pozřel šestnáct sluníček východních (Stocks & Lindsey, 2008). Utrpěl závažné poranění ústní dutiny, protože mu chemické látky ze sluníček silně naleptaly sliznici a samotných šestnáct brouků se jaksí „zabořilo“ hluboko do sliznice tvrdého patra a museli být mechanicky odstraněni.



Obrázek 9: Po sluněčku rozdrceném skládacími automatickými roletami zůstala páchnoucí žlutá skvrna od hemolymfy; foceno tabletem Samsung GALAXY Note 8.0 s komerčně dostupným nastavným makro objektivem.

Existují důkazy o tom, že příchod *H. axyridis* způsobil pokles početnosti původních evropských druhů sluněček (Roy *et al.*, 2012), k nejznatelnějšímu poklesu došlo u *Adalia bipunctata*. Pravděpodobně jsou na vině vnitrocechové kořistnictví (= pojídání druhů s podobnou potravní strategií) a konkurence. Již tři roky po příchodu do ČR se *H. axyridis* na stromech a keřích stala vůbec nejpočetnějším sluněčkem (Ameixa *et al.*, 2010).

2. Cíle práce

Mým cílem je detailně popsat na podzim migrující slunéčka východní, provést jejich fyziologickou a reprodukční charakteristiku a přinést nové poznatky o málo prozkoumaných parazitech potenciálně využitelných v biologickém boji proti slunéčku východnímu. Migrující slunéčka představují směs dvou generací, což nebylo v dosavadních studiích dostatečně zohledněno. Starší jedinci by měli být červenější než ti mladší, protože naakumulovali více karotenoidů. Červené samice by měly být s vyšší pravděpodobností již oplozené. Průběh migrace bude charakterizován změnami jednotlivých parametrů slunéček v průběhu podzimu.

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

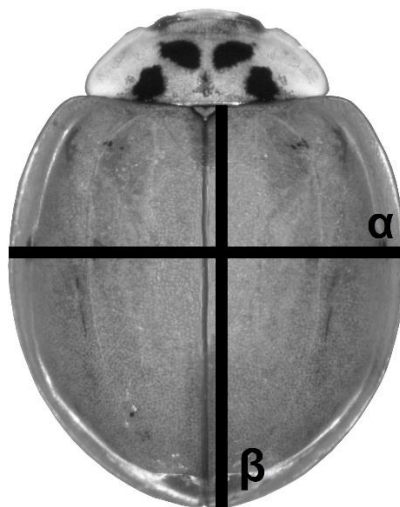
Dospělá slunéčka východní jsme (se školitelem) sbírali při naletování na budovy kolejí Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (48°58'39"N, 14°27'05"E) a v Dlouhé ulici (48°59'19"N, 14°27'23"E) s důrazem na nediskriminování mezi barevnými formami.

- 9. 10. 2014 na budovách kolejí od 13:00 do 14:00 (n = 202), od 14:00 do 15:00 (n = 88), od 15:00 do 16:00 (n = 207)
- 9. 10. 2014 v Dlouhé ulici (n = 112)
- 10. 10. 2014 na budovách kolejí od 13:00 do 14:00 (n = 169), od 15:00 do 16:00 (n = 200)
- 19. 10. 2014 na budovách kolejí od 16:00 do 17:00 (n = 74)
- 10. 11. 2014 na budovách kolejí od 13:00 do 14:00 (n = 50)

Na budovách kolejí jsme zaznamenali také po jednom jedinci od tří druhů našich původních slunéček – *Coccinella septempunctata* Linnaeus, 1758; *Harmonia quadripunctata* (Pontoppidan, 1763) a *Tytthaspis sedecimpunctata* (Linnaeus, 1761). Ze sběru jsme tato slunéčka vytřídili. Z Katalánska (severovýchod Španělska) je známo, že *Harmonia quadripunctata* může pobývat v agregacích spolu s *Harmonia axyridis* (Pons *et al.*, 2015).

3.2 Zpracování

Nasbíraná slunéčka jsme umístili do sklenic se zpřehýbaným filtračním papírem (úкрыt) a kouskem vlhké buničiny (zdroj vody k pití), sklenice jsme pak pomocí gumiček uzavřeli prodyšnou silonovou tkaninou. Takto byla slunéčka několik dní uchována v chladu (5–10°C). Na analytických vahách A&D GR-202 EC jsem stanovil hmotnost každého jedince na nejbližších 0,1 mg. Následně jsem slunéčka po jednom umístil do jamek mikrotitračních destiček, usmrtil a uchoval je v mrazáku při –20°C.



Obrázek 10: Zkratky: α – šířka krovek, β – délka krovek; vlastní fotografie.

Na stereomikroskopu Nikon SMZ 1500 jsem pomocí zobrazení kamerou Lumenera INFINITY 2-5C v programu QuickPHOTO CAMERA 3.0 změřil délku a šířku krovek na nejbližších 0,01 mm. Délku jsem měřil od anteriorního okraje štítku až po vrchol krovek (podél švu krovek), šířku pak kolmo na šev krovek v místě, kde jsou od sebe laterální okraje krovek nejvzdálenější (Obr. 10). Současně jsem za standardizovaného osvětlení a pozadí každé slunéčko vyfotil a uložil jeho digitální fotografii.

U každého jedince jsem určil barevnou formu (*axyridis*, *conspicua*, *spectabilis*, *succinea*) a pohlaví. Pro formy *succinea* jsem provedl subjektivní odhad rozsahu černého zbarvení na krovkách a odhad sytosti zbarvení červeného. Podle rozsahu černého zbarvení jsem slunéčka kategorizoval následovně:

- 1) čistě červenooranžoví jedinci, případně s několika drobnými černými tečkami (Obr. 11: $\beta = 5,38$ mm)
- 2) tečkovaní jedinci, kteří mají ~19 středně velkých teček (Obr. 1)
- 3) silně melanizovaní jedinci, u kterých černé tečky splývají v černý vzor se zbytkovými červenými políčky (Obr. 12: $\beta = 4,86$ mm)



Obrázek 11: Čistě červenooranžový jedinec formy *succinea*; vlastní fotografie.



Obrázek 12: Silně melanizovaný jedinec formy *succinea*; vlastní fotografie.

Podle sytosti červeného zbarvení jsem rozlišoval tři kategorie:

- 1) bledí až žlutí jedinci (Obr. 13)
- 2) oranžoví jedinci (Obr. 14)
- 3) sytě červení jedinci (Obr. 15)



Obrázek 13: Bledý až žlutý jedinec formy *succinea*; ($\beta = 5,55$ mm); vlastní fotografie.

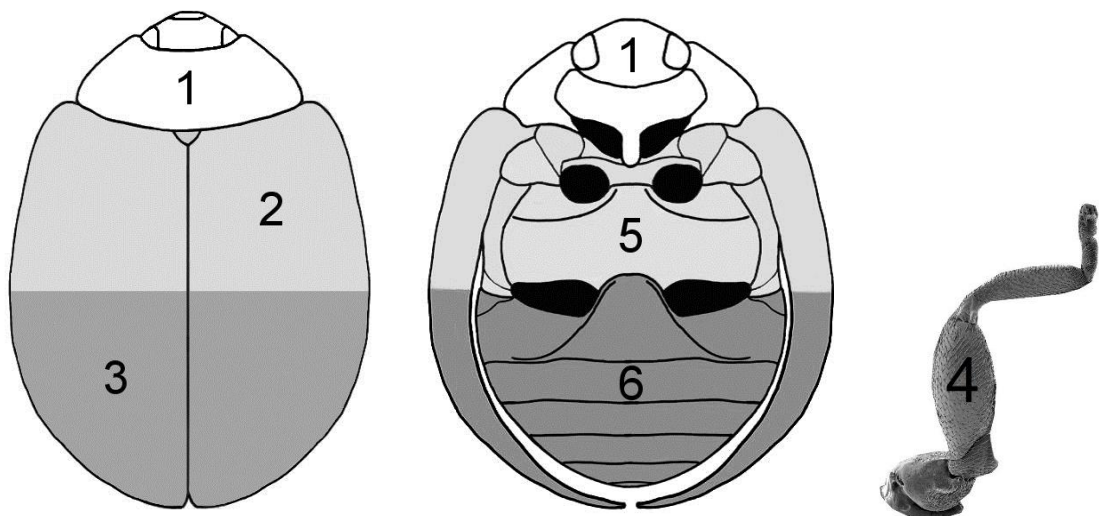


Obrázek 14: Oranžový jedinec formy *succinea*; ($\beta = 5,24$ mm); vlastní fotografie.



Obrázek 15: Červený jedinec formy *succinea*; ($\beta = 5,77$ mm); šipka ukazuje plodnice *Hesperomyces virescens*; vlastní fotografie.

Při pozorování pod stereomikroskopem jsem kvalitativně mapoval výskyt parazitické houby *Hesperomyces virescens*. Povrch sluníček jsem k tomuto účelu pomyslně rozdělil do šesti zón (Nalepa & Weir, 2007; Obr. 16). Plodnice *H. virescens* jsem pro ilustraci nafotil na mikroskopu RTL PC-2 v programu DinoCapture 2.0 (Obr. 5; Obr. 6; Obr. 7).



Obrázek 16: Šest zón vymezených na tělech sluníček k zaznamenávání plodnic *Hesperomyces virescens*. (Nákres převzat z Nedvěda, 2015; zóny podle Nalepy & Weira, 2007.)

Každému sluníčku jsem nůžtičkami odštíhl krovky v místě jejich připojení ke hrudi a umístil je do 1 ml 96% etanolu. Takto připravené vzorky jsem nechal několik týdnů extrahovat v chladu (5–10°C). Na spektrofotometru UVmini-1240 jsem následně změřil absorbanci každého vzorku při 450 nm. Jelikož karotenoidy se řídí Lambert-Beerovým zákonem (absorbance je přímo úměrná jejich koncentraci ve vzorku), je měření absorbance vhodné ke stanovení celkové koncentrace karotenoidů v karotenoidovém extraktu z krovek (Scott, 2001).

Každé samici jsem v Ringerově roztoku pod stereomikroskopem vypitval spermatéku a následně ji rozlomil, abych zaznamenal oplozenost (spermie ve spermatéce).

Přítomnost hlístic rodu *Parasitylenchus* (Tylenchomorpha: Allantonematidae) v tělní dutině jsem zaznamenal u 49 samic pitvaných za čerstva (nikoli po zmražení; 9. 10. 2014, n = 29; 10. 11. 2014, n = 20).

Statistické analýzy

Odlišnosti v tělesných rozměrech mezi pohlavími a jednotlivými barevnými formami jsme testovali dvoucestnou analýzou variance (*two-way ANOVA*). Následně jsme procedurou *Nonlinear estimation* zvláště pro samce a pro samice vynesli mocninovou regresi vztahu šířky a délky podle funkce $y = a + b \times x^c$, kde y je šířka, x je délka. Formu *axyridis* jsme z analýzy vyloučili, protože byla zastoupena pouze samci.

Jednocestnou analýzou variance (*one-way ANOVA*) jsme analyzovali rozdíly v hmotnosti mezipohlavně a mezi oplozenými a neoplozenými samicemi.

Jednocestnou ANOVA s post hoc porovnáváním pomocí Fischerova LSD (*least significant difference*) testu jsme analyzovali odlišnosti v zaznamenaných parametrech mezi vzorky nasbíranými v jednotlivých dnech migrace. Při zjištění signifikantních rozdílů mezi vzorky jsme stanovili rovnice závislosti a proložili závislosti jednotlivých parametrů charakterizujících sluněčka na uplynulých dnech od 1. října regresními křivkami.

Rozdíly mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného rozsahu černého zbarvení forem *succinea* ve dni migrace a načasování migrace v průběhu dne jsme zjišťovali jednocestnou ANOVA s post hoc porovnáváním Fischerovým LSD testem.

Efekt denní doby a dne migrace jako kategoriálních proměnných jsme studovali pomocí dvoucestné analýzy variance bez interakcí (*main effects ANOVA*) s post hoc porovnáváním Fischerovým LSD testem. Existenci interakce jsme se rozhodli a priori zamítnout kvůli absenci faktoriálního uspořádání dat – neměli jsme data sbíraná v určité době pro všechny dny, kdy byl prováděn sběr.

Dále jsme jednocestnou ANOVA s Fischerovým LSD testem zjišťovali rozdíly v absorbanci či absorbanci přepočtené na hmotnost, oplozenosti a hmotnosti mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu krovek (včetně kategorie nemelanických a melanických forem). Stejně jsme analyzovali rozdíly v absorbanci přepočtené na hmotnost mezi jednotlivými barevnými formami. U forem *succinea* jsme testovali rozdíly v absorbanci přepočtené na hmotnost mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného rozsahu černého zbarvení.

Jednocestnou ANOVA jsme analyzovali prostou parazitovanost mezi oplozenými a neoplozenými samicemi.

Mezipohlavní rozdíly v průměrném počtu zón obsazených *Hesperomyces virescens* jsme testovali jednocestnou ANOVA. Vzhledem k narušení předpokladu normálního

rozdělení dat jsme se rozhodli ještě provést Kruskal-Wallisův test – neparametrickou analogii jednocestné ANOVA.

Jednocestnou ANOVA jsme dále zjišťovali rozdíly v průměrném počtu obsazených zón na jednoho jedince mezi jednotlivými dny migrace, mezi barevnými formami, mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu a mezi oplozenými a neoplozenými samicemi.

Odlišnosti v hmotnosti a absorbanci přepočtené na hmotnost mezi jedinci s různým počtem obsazených zón jsme testovali jednocestnou ANOVA s Fischerovým LSD testem.

Odlišnosti v součinu délky a šířky mezi jedinci zdravými či s jednou obsazenou zónou a jedinci s více než jednou obsazenou zónou jsme testovali dvouvýběrovým t-testem.

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti druhé a třetí zóny a obsazenosti páté a šesté zóny jsme zjišťovali jednocestnou ANOVA.

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti každé jednotlivé zóny jsme testovali Kruskal-Wallisovým neparametrickým testem.

Korelaci mezi napadením v jednotlivých zónách jsme kvantifikovali Spearmanovým koeficientem pořadové korelace (*Spearman's rank correlation coefficient*), který nevyžaduje normalitu dat.

Rozdíly v oplozenosti, hmotnosti a absorbanci přepočtené na hmotnost mezi samicemi parazitovanými hlísticí (*Parasitylenchus*) i houbou (*H. virescens*) a zbytkem samic jsme testovali jednocestnou ANOVA. Stejně jsme zjišťovali vliv pouhé napadenosti hlísticí na oplozenost a hmotnost samic.

Ke zpracování dat a tvorbě grafů jsme použili program Statistica 12. Mezipohlavní analýzu hmotnosti jsem provedl v Microsoft Excel 2013. Výsledky uvádím jako průměr \pm střední chyba průměru (SE).

4. Výsledky

4.1 Zastoupení pohlaví a forem, reprodukční stav

Z celkového počtu 1102 jedinců bylo 523 samic (47 %) a 579 samců (53 %), z hlediska barevných forem 3 jedinci (0,3 %) formy *axyridis*, 29 jedinců (2,6 %) formy *conspicua*, 88 jedinců (8 %) formy *spectabilis* a 982 jedinců (89,1 %) formy *succinea*. Oplozených samic bylo celkem 259 (49,5 %). Průměrně bylo oplozeno (počítáno za čtyři dny sbírání) 47,1 % samic.

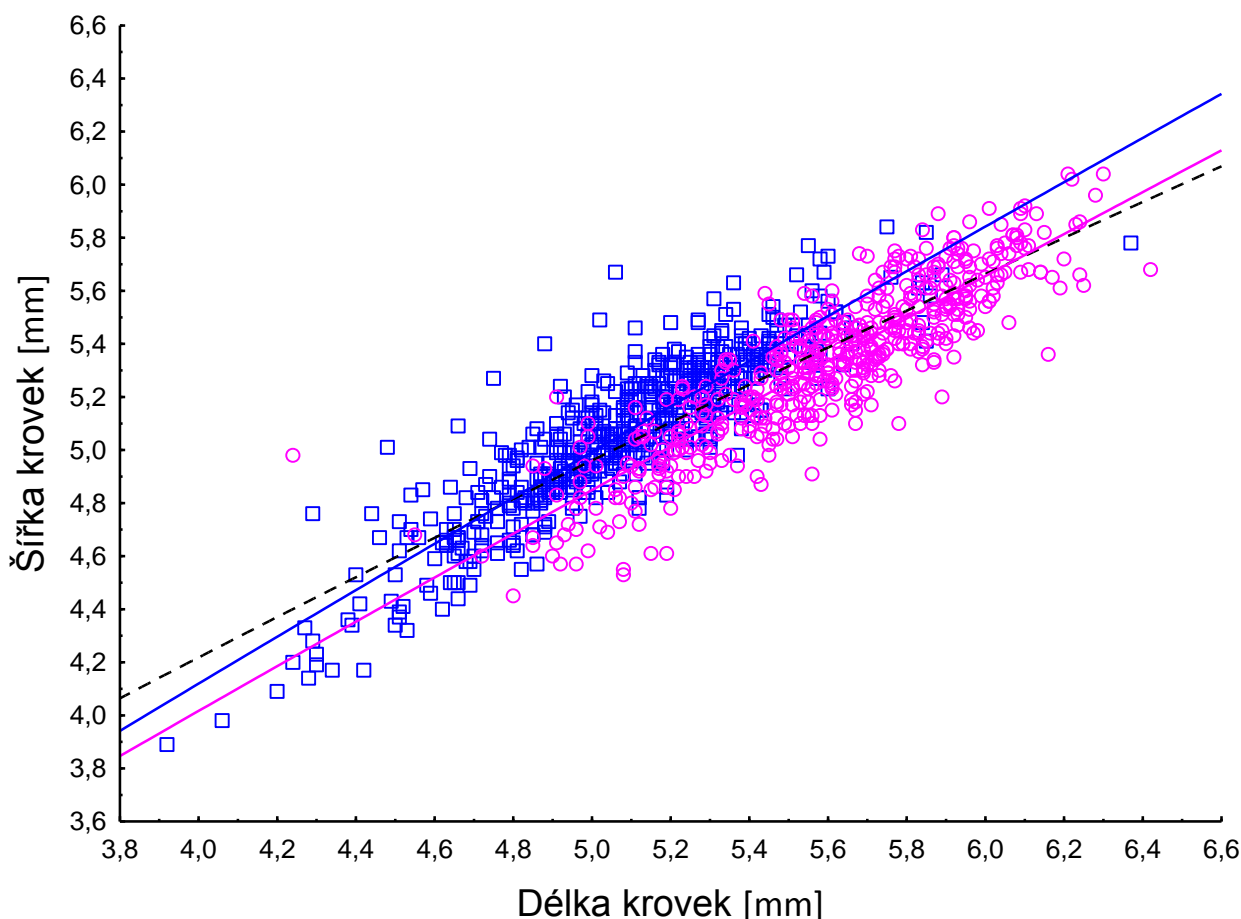
4.2 Subjektivní charakteristika formy *succinea*

Z hlediska termálního melanismu bylo z celkového počtu 982 jedinců formy *succinea* 176 jedinců (17,9 %) s malým rozsahem černé, 768 jedinců (78,2 %) se středním rozsahem černé a 38 jedinců (3,9 %) s velkým rozsahem černé kresby na krovkách.

Z celkového počtu 982 jedinců formy *succinea* bylo z hlediska odstínu krovek 267 jedinců (27 %) červených, 696 jedinců (71 %) oranžových a 19 jedinců (2 %) žlutých.

4.3 Tělesné rozměry

Samci a samice se průkazně lišili v tělesných rozměrech – v délce (dvoucestná ANOVA: $F_{1, 1093} = 123,7$; $p < 0,0001$) i šířce krovek (dvoucestná ANOVA: $F_{1, 1093} = 30,3$; $p < 0,00001$). Samci měli krovky dlouhé $5,10 \pm 0,03$ mm a široké $5,09 \pm 0,03$ mm, samice $5,61 \pm 0,03$ mm dlouhé a $5,33 \pm 0,03$ mm široké. Pohlaví mělo značný vliv i na poměr délky a šířky krovek (dvoucestná ANOVA: $F_{1, 1093} = 146,7$; $p < 0,0001$), u samců byl poměr $1,003 \pm 0,003$, u samic $1,054 \pm 0,003$. Barevná forma ani interakce barevné formy s pohlavím neměly na šířku, délku či poměr délky a šířky krovek signifikantní vliv. Použití poměru předpokládá lineární vztah mezi šířkou a délkou, ale mezi morfologickými strukturami je obvykle vztah alometrický, obvykle popisovaný mocninnou funkcí. Pro samce vychází funkce: šířka = $1,25 (\pm 0,04) \times \text{délka}^{0,86 (\pm 0,02)}$, korelační koeficient $R = 0,89$. Pro samice vychází: šířka = $1,25 (\pm 0,04) \times \text{délka}^{0,84 (\pm 0,02)}$, $R = 0,88$. Menší jedinci měli šířku krovek větší nebo blízkou délce krovek, větší jedinci byli však poněkud protáhlí. U samců a samic byl tento vztah stejný, jen hodnoty byly posunuté (Graf 1). Proto se samice zdají spíše protáhlé.



Graf 1: Alometrický vztah šířky a délky krovek; modré čtverce = samci; růžová kolečka = samice; černá přerušovaná čára = mocninná regrese pro všechny jedince dohromady.

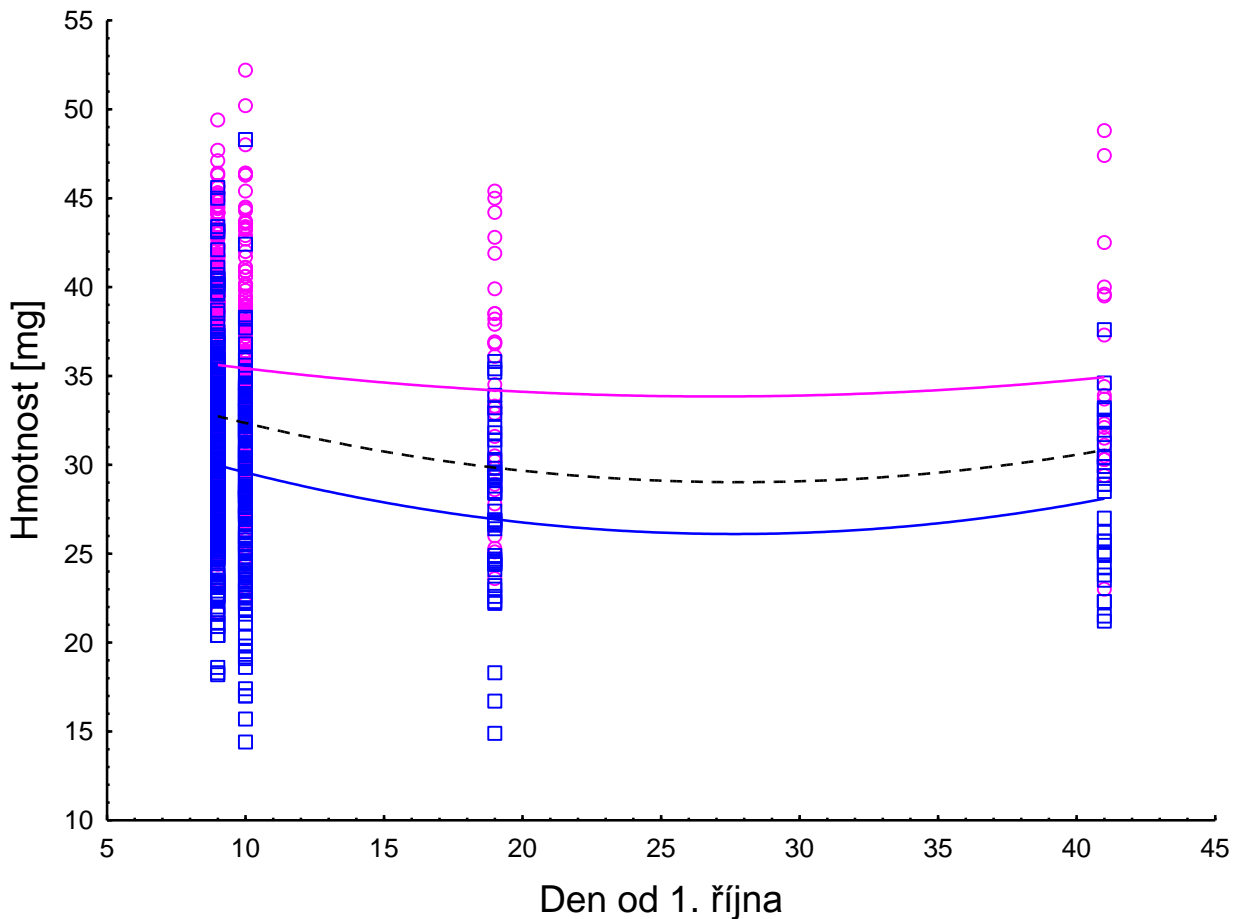
4.4 Hmotnost

Mezipohlavní rozdíly v hmotnosti byly signifikantní (jednocestná ANOVA: $F_{1, 1100} = 334,15$; $p < 10^{-5}$). Průměrná hmotnost samců byla $29,5 \pm 0,2$ mg; samic $35,4 \pm 0,2$ mg.

Mezi oplozenými a neoplozenými samicemi nebyly rozdíly v hmotnosti průkazné (jednocestná ANOVA: $F_{1, 521} = 1,55$; $p = 0,21$).

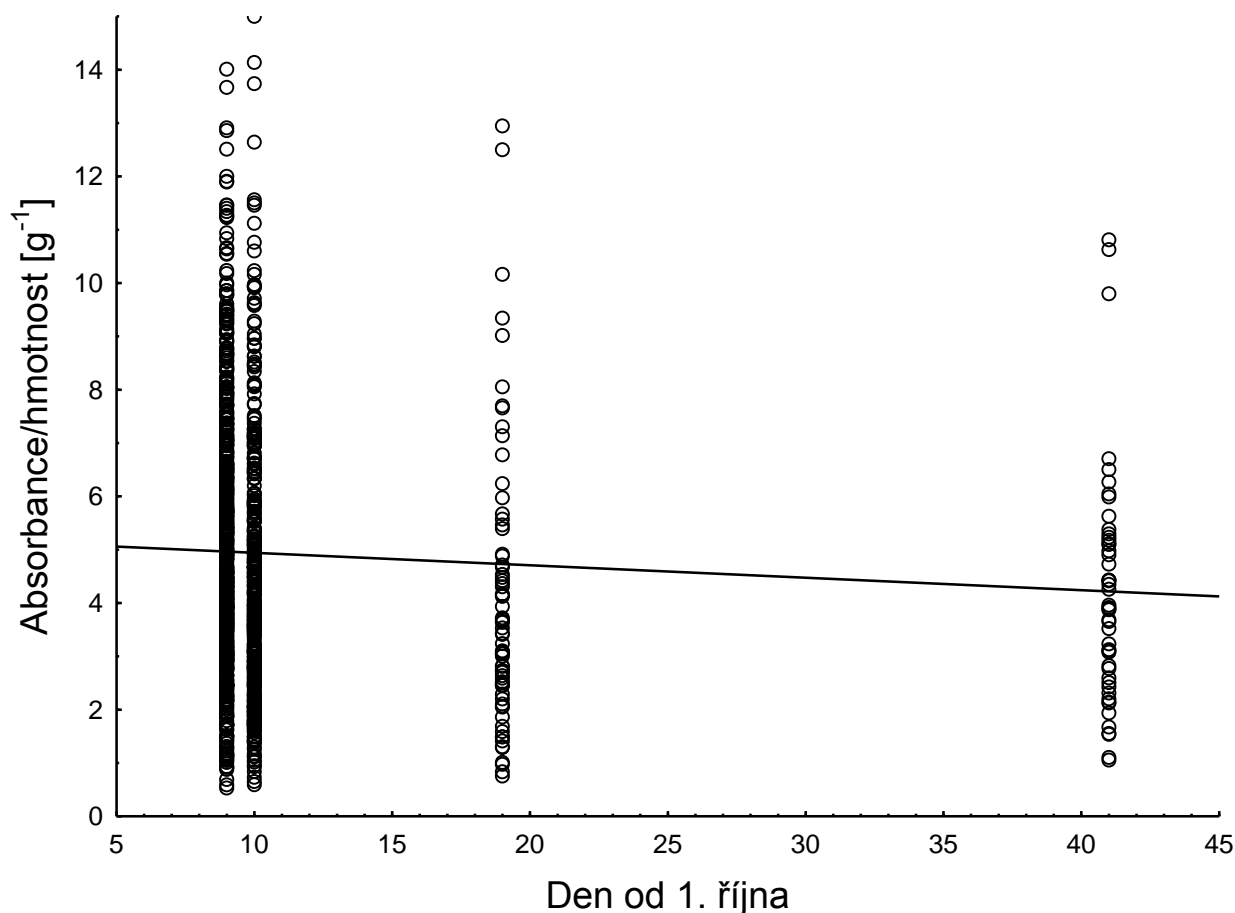
4.5 Proměnlivost sledovaných parametrů během podzimní migrace

V hmotnosti migrujících jedinců mezi jednotlivými dny migrace byly signifikantní odlišnosti (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 8,02$; $p = 0,00003$). První den se lišil od všech ostatních ($p = 0,0002$; $p = 0,0009$; $p = 0,01$), ostatní dny se mezi sebou signifikantně nelišily ($p = 0,06$; $p = 0,30$; $p = 0,65$). Hmotnost sluníčků s časem průkazně poklesla podle kvadratické funkce: $\text{hmotnost} = a + b \times \text{den} + c \times \text{den}^2$ (Graf 2). Parametry: $a = 37,13 (\pm 1,35)$, $p < 10^{-6}$; $b = 0,58 (\pm 0,17)$, $p = 0,0007$; $c = 0,0105 (\pm 0,0035)$, $p = 0,003$.



Graf 2: Čerstvá hmotnost migrujících slunéček od 9. října do 10. listopadu 2014; modré čtverce = samci; růžová kolečka = samice; černá přerušovaná čára = kvadratická regrese pro všechny jedince dohromady.

Mezi jedinci migrujícími v různých dnech byly signifikantní rozdíly také v absorpanci (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 8,02$; $p = 0,00003$), která vykazovala téměř shodný průběh v čase jako hmotnost. Proto jsme zavedli novou proměnnou – podíl absorpance a hmotnosti s jednotkami reciproký gram (g^{-1}). I tento podíl se mezi jednotlivými dny signifikantně lišil (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 4,36$; $p = 0,005$). Při proložení jeho průběhu v čase kvadratickou křivkou vycházel kvadratický člen nesignifikantní, a tak jsme přešli na lineární rovnici. Podíl absorpance a hmotnosti klesal s časem podle funkce: $\text{absorbance} \times \text{hmotnost}^{-1} = a + b \times \text{den}$ (Graf 3). Parametry: $a = 5,17 (\pm 0,16)$, $p < 10^{-6}$; $b = -0,023 (\pm 0,012)$, $p = 0,046$.



Graf 3: Absorbance na gram čerstvé hmotnosti migrujících sluněček od 9. října do 10. listopadu 2014.

Dále byly signifikantní odlišnosti v parazitovanosti migrujících jedinců houbou *Hesperomyces virescens* v jednotlivých dnech (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 4,94$; $p = 0,002$). Ve druhém vzorku byla parazitovanost vyšší, pak klesala. Proložení kvadratickou křivkou ukázalo nevýznamný trend. Pro b: $p = 0,97$; pro c: $p = 0,76$.

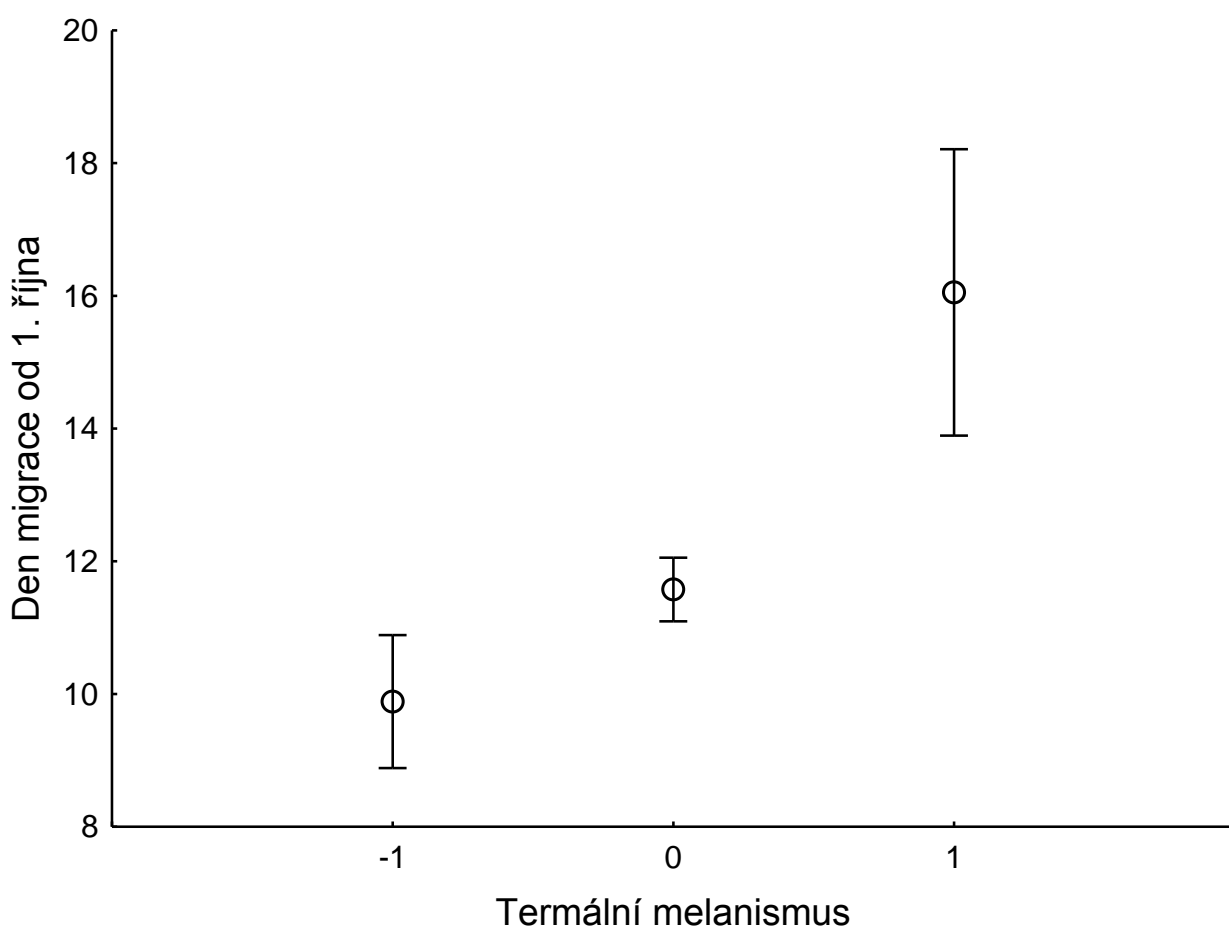
Tabulka 1: Odlišnosti v zaznamenaných parametrech mezi vzorky nasbíranými v jednotlivých dnech migrace: jednocestné ANOVA.

Parametr	F	df	p
Délka	0,80	3, 1098	0,49
Šířka	0,75	3, 1098	0,52
Hmotnost	8,02	3, 1098	0,00003
Absorbance	10,80	3, 1098	< 0,0001
Absorbance $\times g^{-1}$	4,36	3, 1098	0,005
Oplozenost	0,94	3, 519	0,42
Parazitovanost	4,94	3, 1098	0,002
Pohlaví	1,20	3, 1098	0,31
Formy	0,49	3, 1098	0,69
Odstín	1,43	3, 1098	0,23

Jedinci migrující v různých dnech se nelišili statisticky významně v délce a šířce krovek, oplozenosti, zastoupení pohlaví, zastoupení barevných forem a v subjektivně odhadovaném odstínu krovek (Tabulka 1).

4.6 Migrace různě melanizovaných jedinců formy *succinea*

Mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného rozsahu černého zbarvení na krovkách byly statisticky významné odlišnosti v průměrném dni migrace (jednocestná ANOVA: $F_{2, 979} = 13,6$; $p < 10^{-5}$). Každá kategorie se lišila od každé ($p = 0,003$ až $p = 10^{-5}$). Průměrné dny ulovení (= migrace) byly následující: $9,9 \pm 0,5$ dne pro jedince s malým rozsahem černé; $11,6 \pm 0,2$ dne pro jedince se středním rozsahem černé; $16,1 \pm 1,1$ dne pro jedince s velkým rozsahem černé kresby (Graf 4).



Graf 4: Migrace různě melanizovaných jedinců formy *succinea*; -1 = čistě červenooranžoví jedinci; 0 = tečkovaní jedinci; 1 = silně melanizovaní jedinci. Průměr ± S.E.

Odlišnosti v načasování migrace v průběhu dne mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného rozsahu černého zbarvení na krovkách nebyly signifikantní.

4.7 Proměnlivost sledovaných parametrů během dne a během sezóny

Některé statistické testy jsme zopakovali při současném analyzování data a denní doby migrace (Tabulka 2). Potvrdili jsme signifikantní vliv dne migrace na hmotnost sluněček (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 5,01$; $p = 0,007$). Poslední den se signifikantně lišil od ostatních ($p = 0,016$; $p = 0,02$; $p = 0,007$), první tři se mezi sebou nelišily ($p = 0,56$; $p = 0,58$; $p = 0,84$). Denní doba na hmotnost neměla signifikantní vliv.

Na absorbanci měl signifikantní vliv den migrace (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 8,39$; $p = 0,0002$) i denní doba (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 3,81$; $p = 0,007$). V průběhu sezóny došlo k poklesu a následné stagnaci absorbance, v průběhu dne nejdříve stoupla, pak poklesla ještě níže pod původní úroveň. Podobně se měnil podíl absorbance a hmotnosti – signifikantně se lišil mezi jednotlivými dny (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 3,85$; $p = 0,022$) i v průběhu dne (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 3,79$; $p = 0,023$). Během sezóny klesl, pak stagnoval a během dne ve 14:00 narostl a následně opět poklesl.

Denní doba měla signifikantní vliv na oplozenost samic (*main effects ANOVA*: $F_{3, 519} = 3,16$; $p = 0,043$). Nejvyšší byla ve 14:00, kdy se signifikantně lišila od ostatních časů ($p = 0,024$; $p = 0,024$; $p = 0,026$), pak klesala. Rozdíly v oplozenosti mezi jednotlivými dny migrace nebyly signifikantní.

Na parazitovanost měl opět významný vliv den migrace (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 5,36$; $p = 0,005$), její průběh byl stejný jako při jednoduché analýze výše. Rozdíly v parazitovanosti v průběhu dne nebyly signifikantní.

Rozdíly v zastoupení pohlaví v průběhu dne byly signifikantní (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 4,51$; $p = 0,01$). Ve 14:00 ubylo samic, a pak jich zase přibylo (rozdíl od 13:00: $p = 0,016$; od 15:00: $p = 0,006$; od 16:00: $p = 0,33$). Rozdíly v zastoupení pohlaví mezi dny migrace nebyly signifikantní.

Jedinci migrující v různou denní dobu se statisticky významně lišili v subjektivně odhadovaném odstínu krovek (*main effects ANOVA*: $F_{3, 1098} = 21,0$; $p < 0,00001$). Ve 14:00 došlo k velkému nárůstu zastoupení červených jedinců, pak jejich zastoupení kleslo na původní hladinu ($p < 10^{-6}$). Rozdíly v odstínu krovek mezi dny migrace nebyly signifikantní.

Denní doba a den migrace neměly signifikantní vliv na délku nebo šířku krovek a zastoupení barevných forem.

Tabulka 2: Vliv dne migrace a denní doby na sledované parametry: dvoucestné ANOVA (bez interakcí = *main effects*).

Parametr	F	df	p
Denní doba			
Délka	2,66	3, 1098	0,07
Šířka	1,05	3, 1098	0,35
Hmotnost	0,17	3, 1098	0,84
Absorbance	3,81	3, 1098	0,022
Absorbance $\times g^{-1}$	3,79	3, 1098	0,023
Oplozenost	3,16	3, 519	0,043
Parazitovanost	1,26	3, 1098	0,28
Pohlaví	4,51	3, 1098	0,01
Formy	0,36	3, 1098	0,70
Odstín	21,00	3, 1098	< 0,00001
Den migrace			
Délka	0,89	3, 1098	0,41
Šířka	0,76	3, 1098	0,47
Hmotnost	5,01	3, 1098	0,007
Absorbance	8,39	3, 1098	0,0002
Absorbance $\times g^{-1}$	3,85	3, 1098	0,022
Oplozenost	0,53	3, 519	0,59
Parazitovanost	5,36	3, 1098	0,005
Pohlaví	1,13	3, 1098	0,32
Formy	0,53	3, 1098	0,59
Odstín	0,53	3, 1098	0,59

4.8 Analýza barvy

Mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu byly signifikantní rozdíly v absorbanci (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 78,4$; $p < 10^{-4}$). Nejvyšší průměrnou absorbanci měli červení jedinci ($0,213 \pm 0,005$), pak postupně oranžoví ($0,142 \pm 0,003$), melaničtí ($0,119 \pm 0,007$) a žlutí ($0,055 \pm 0,017$) jedinci.

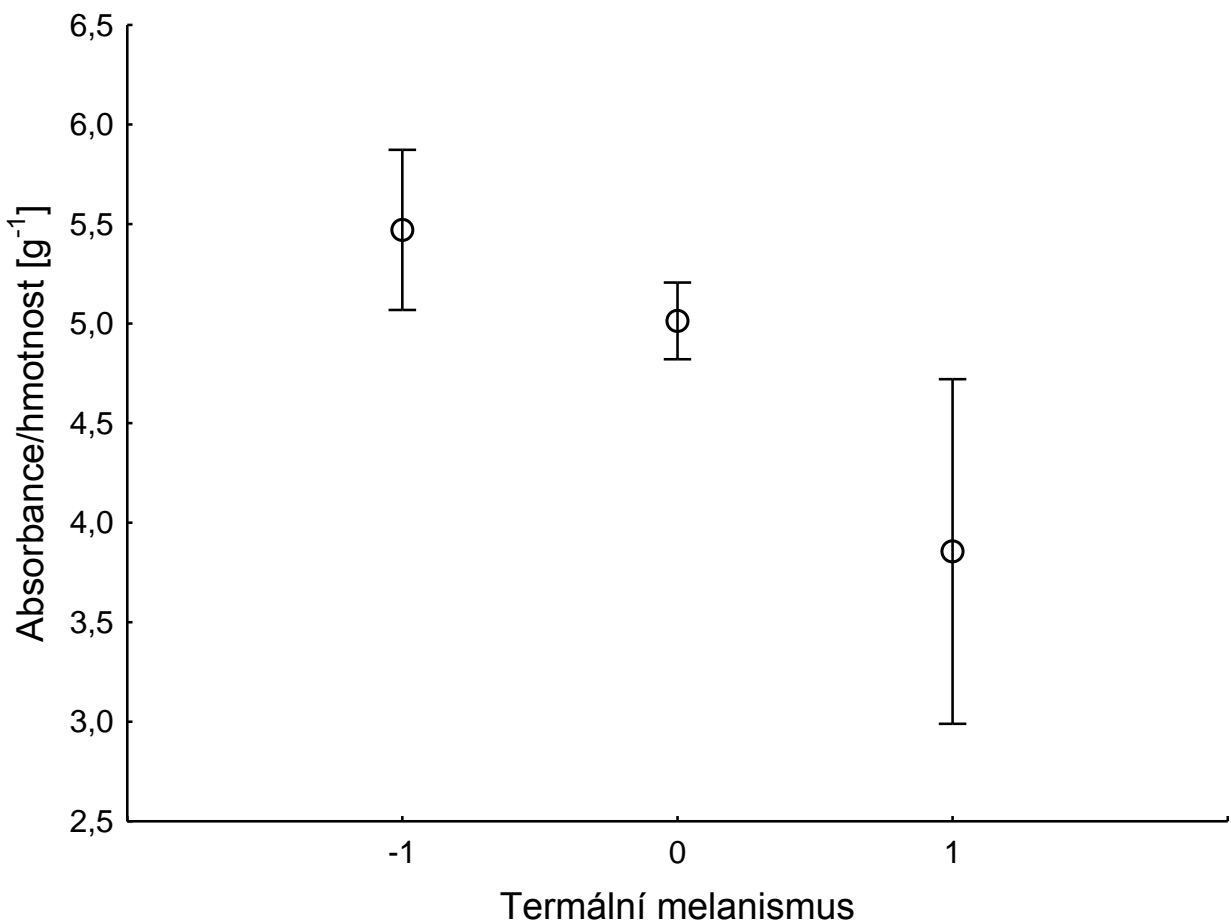
Mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu byly signifikantní rozdíly také v absorbanci přepočtené na hmotnost (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 78,6$; $p < 10^{-4}$). Všechny kategorie se průkazně lišily od všech (i oranžová od melanické) na hladině významnosti $p = 0,001$. Nejvyšší průměrnou absorbanci na gram měli červení jedinci ($6,74 \pm 0,15 g^{-1}$), pak postupně oranžoví ($4,5 \pm 0,09 g^{-1}$), melaničtí ($3,72 \pm 0,22 g^{-1}$) a žlutí ($1,59 \pm 0,56 g^{-1}$) jedinci.

Mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu byly signifikantní rozdíly v oplozenosti samic (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 19,6$; $p < 10^{-5}$). Červené samice se signifikantně lišily od všech ostatních (od oranžových: $p = 10^{-6}$; od melanických: $p = 0,0002$; od žlutých: $p = 0,007$). Oplozených červených samic bylo 77 ± 4 %; oranžových 39 ± 3 %; žlutých 36 ± 14 %; melanických 48 ± 6 %.

Rozdíly v hmotnosti mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu nebyly průkazné (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 1,16$; $p = 0,32$). Průměrná hmotnost žlutých

jedinců byla $34,9 \pm 1,41$ mg; oranžových $32,3 \pm 0,23$ mg; červených $32,2 \pm 0,38$ mg; melanických $32,2 \pm 0,56$ mg.

Mezi barevnými formami byly signifikantní rozdíly v absorbanci přepočtené na hmotnost (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 9,3$; $p < 10^{-5}$). Forma *succinea* se lišila od formy *spectabilis* ($p = 0,00005$) a od formy *conspicua* ($p = 0,001$). Formy *spectabilis* a *conspicua* se mezi sebou nelišily signifikantně, stejně tak se nelišila forma *axyridis* od všech ostatních forem. Nejvyšší průměrnou absorbanci na gram měla forma *axyridis* ($5,49 \pm 1,53$ g⁻¹), pak postupně forma *succinea* ($5,05 \pm 0,08$ g⁻¹), *spectabilis* ($3,78 \pm 0,028$ g⁻¹) a forma *conspicua* ($3,44 \pm 0,49$ g⁻¹).



Graf 5: Absorbance na gram čerstvé hmotnosti různě melanizovaných jedinců formy *succinea*; -1 = čistě červenooranžoví jedinci; 0 = tečkovaní jedinci; 1 = silně melanizovaní jedinci. Průměr ± S.E.

U forem *succinea* se absorbance přepočtená na hmotnost signifikantně lišila mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného rozsahu černého zbarvení (jednocestná ANOVA: $F_{2, 979} = 5,84$; $p = 0,003$). Všechny kategorie se mezi sebou statisticky významně lišily ($p = 0,04$ mezi malým a středním rozsahem černé; $p = 0,01$ mezi středním a velkým rozsahem černé). Jedinci s malým rozsahem černé měli vysokou absorbanci na gram, jedinci se středním rozsahem černé měli střední absorbanci na gram, jedinci s velkým rozsahem černé měli nízkou absorbanci na gram (Graf 5).

4.9 Detailní analýza parazitovanosti houbou *Hesperomyces virescens*

Plodnice *H. virescens* jsem zaznamenal na 287 jedincích (= prevalence 26 %). Z 287 napadených jedinců bylo 166 samců a 121 samic. V celkovém vzorku bylo napadeno 28,7 % samců a 23,1 % samic. Prevalence byla tedy vyšší u samců.

Nejvíce jedinců (224) bylo napadeno ve třetí zóně, pak postupně v šesté (91 jedinců), čtvrté (70 jedinců), páté (65 jedinců), druhé (26 jedinců) a první (19 jedinců).

Mezi oplozenými a neoplozenými samicemi byly signifikantní rozdíly v prosté kvalitativní parazitovanosti (jednocestná ANOVA: $F_{1, 521} = 51,5$; $p < 10^{-5}$). Oplozené (= spášené) samice byly více parazitované ($35,9 \pm 2,5$ %) než ty neoplozené ($10,6 \pm 2,5$ %).

Mezipohlavní rozdíly v počtu zón obsazených *H. virescens* byly signifikantní (jednocestná ANOVA: $F_{1, 1100} = 36$; $p < 10^{-5}$). Na samce připadal průměrně větší počet obsazených zón ($0,61 \pm 0,04$) než na samici ($0,27 \pm 0,04$). Při neparametrickém testování vycházely rozdíly taktéž signifikantní (Kruskal-Wallisův test: $\chi^2 = 4,1$; $df = 1$; $p = 0,04$).

Rozdíly v průměrném počtu obsazených zón na jednoho jedince mezi jednotlivými dny migrace byly signifikantní (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 5,9$; $p = 0,0005$). První den na jednoho jedince připadalo $0,37 \pm 0,4$ zóny; druhý den $0,62 \pm 0,05$ zóny; třetí den $0,38 \pm 0,11$ zóny a čtvrtý den $0,26 \pm 0,13$ zóny.

Mezi barevnými formami nebyly průkazné rozdíly v průměrném počtu obsazených zón na jednoho jedince (jednocestná ANOVA: $F_{3, 1098} = 0,15$; $p = 0,93$).

Mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu forem *succinea* byly signifikantní rozdíly v průměrném počtu obsazených zón na jednoho jedince (jednocestná ANOVA: $F_{2, 979} = 38,2$; $p = 10^{-5}$). Nejvyšší průměrný počet obsazených zón měli červení jedinci ($0,86 \pm 0,06$), pak následovali oranžoví ($0,29 \pm 0,03$) a žlutí ($0,16 \pm 0,21$) jedinci.

Oplozené a neoplozené samice se signifikantně lišily v průměrném počtu obsazených zón (jednocestná ANOVA: $F_{1, 521} = 44,9$; $p < 10^{-5}$). Oplozené samice měly průměrně obsazeno $0,43 \pm 0,03$ zóny; neoplozené samice $0,12 \pm 0,03$ zóny.

Rozdíly v hmotnosti mezi jedinci s různým počtem obsazených zón byly statisticky průkazné (jednocestná ANOVA: $F_{6, 1095} = 4,5$; $p = 0,0002$). Jedinci s žádnou obsazenou zónou se lišili od jedinců s jednou obsazenou zónou na hladině významnosti $p = 0,02$. Jedinci s dvěma a třemi obsazenými zónami se lišili mezi sebou a od zbytku kategorií ($p = 0,01$ až $p = 0,001$). Nejvyšší průměrnou hmotnost měli jedinci s žádnou a s jednou obsazenou zónou, jedinci s více obsazenými zónami byli lehčí. Počet napadených jedinců s rostoucím počtem napadených zón rapidně klesal, a tak byly odhady průměrné hmotnosti při větším počtu zón méně přesné (Tabulka 3).

Rozdíly v absorbanci přepočtené na hmotnost mezi jedinci s různým počtem obsazených zón byly signifikantní (jednocestná ANOVA: $F_{6, 975} = 4,1$; $p = 0,0004$). Jedinci s více obsazenými zónami měli vyšší absorbanci přepočtenou na hmotnost (Tabulka 3).

Tabulka 3: Hmotnost a absorbance na gram čerstvé hmotnosti jedinců s různým počtem parazitovaných zón. Průměr ± S.E.

Počet plných zón	n	Hmotnost	Absorbance × g ⁻¹
0	815	32,4 ± 0,2	4,9 ± 0,1
1	177	33,6 ± 0,5	5,3 ± 0,2
2	51	29,8 ± 0,9	6,1 ± 0,4
3	29	29,2 ± 1,1	6,0 ± 0,5
4	22	30,2 ± 1,3	6,3 ± 0,6
5	6	30,5 ± 2,5	7,8 ± 1,2
6	2	30,6 ± 4,3	6,3 ± 1,9

Odlišnosti v součinu délky a šířky mezi jedinci zdravými či s jednou obsazenou zónou a jedinci s více než jednou obsazenou zónou byly signifikantní (dvouvýběrový t-test: $t = 6,2$; $df = 1100$; $p < 0,000001$). Pro jedince s jednou či žádnou obsazenou zónou vyšel průměrný součin $28,03 \pm 0,12 \text{ mm}^2$; pro jedince napadené ve více zónách $25,74 \pm 0,34 \text{ mm}^2$.

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti druhé a třetí zóny nebyly signifikantní (jednocestná ANOVA: $F_{1, 1100} = 0,2$; $p = 0,66$).

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti páté a šesté zóny signifikantní byly (jednocestná ANOVA: $F_{1, 1100} = 69$; $p < 10^{-5}$). Na samce připadalo $0,25 \pm 0,02$ zóny, na samici $0,02 \pm 0,02$ zóny.

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti jednotlivých zón byly signifikantní pro první, čtvrtou, pátou a šestou zónu, v nichž byli samci napadenější než samice (Tabulka 4).

Tabulka 4: Kruskal-Wallisovy testy mezipohlavních rozdílů v obsazenosti jednotlivých zón.

Zóna	χ^2	df	p
1	5,40	1	0,02
2	0,07	1	0,79
3	0,16	1	0,69
4	48,70	1	$< 10^{-4}$
5	58,40	1	$< 10^{-4}$
6	52,90	1	$< 10^{-4}$

Napadení korelovalo mezi všemi zónami. Mezi většinou zón: $\rho = 0,11$ až $0,28$. Mezi čtvrtou, pátou a šestou zónou pak: $\rho = 0,66$ až $0,69$.

4.10 Samice vyšetřené na přítomnost hlístic

Ze 49 vyšetřených samic bylo 12 (24 %) napadeno houbou *H. virescens* a 23 (47 %) hlísticí rodu *Parasitylenchus*. Koinfekce houbou i hlísticí se vyskytla u 7 jedinců (14 %), což je téměř náhodná shoda.

Pouhá přítomnost hlístice neměla signifikantní vliv na hmotnost (jednocestná ANOVA: $p = 0,06$) nebo oplozenost (jednocestná ANOVA: $p = 0,15$) samic. Všechny ko-infikované samice byly oplozené, zatímco zbylých samic bylo oplozeno jen $57 \pm 0,08$ % (jednocestná ANOVA: $F_{1,47} = 5,04$; $p = 0,03$).

Ko-infikované samice měly oproti ostatním signifikantně vyšší hmotnost (jednocestná ANOVA: $F_{1,47} = 4,81$; $p = 0,03$) i absorbančí (jednocestná ANOVA: $F_{1,47} = 11,08$; $p = 0,0017$). Průměrná hmotnost ko-infikovaných samic byla $40,8 \pm 2,3$ mg; zbylých samic pak $35,1 \pm 0,99$ mg. Průměrná absorbance extraktu z krovek ko-infikovaných samic byla $0,283 \pm 0,05$; u zbylých samic pak $0,161 \pm 0,01$.

5. Diskuse

5.1 Zastoupení pohlaví a forem, reprodukční stav

Zastoupení barevných forem v naší studii bylo podobné ostatním evropským zemím (Brown *et al.*, 2008), Slovensku (Panigaj *et al.*, 2014) a výsledkům dřívější studie charakterizující českou populaci (Nedvědová *et al.*, 2013), s tím, že jsem zaznamenal i vzácnou formu *axyridis*, která je běžná v západní části původního areálu (Dobzhansky, 1933). Vcelku konzistentní frekvence barevných forem napříč Evropou je přičítána genetické podobnosti v důsledku rozšíření evropské populace z jedné omezené oblasti (Brown *et al.*, 2008).

Poměr pohlaví v celkovém vzorku byl mírně vychýlený ve prospěch samic (53 %), ve sběrech z jednotlivých dnů bylo 51 až 60 % samic. Nedvědová *et al.* (2013) zjistili v ČR na podzim roku 2009 vychýlení pohlaví ve prospěch samic (46 % samic) s tím, že v jednotlivých dnech migrace kolísalo zastoupení samic od 36 do 52 %. Menší zastoupení samic bývá vysvětlováno přítomností bakteriálních endosymbiontů, kteří zabíjejí samčí embrya ve snůškách a poskytují výhodu infikovaným samicím v podobě kanibalizovatelných nevylíhlých vajíček (Majerus & Hurst, 1997). Poměr pohlaví u *H. axyridis* během roku fluktuuje, samci na jaře 2012 tvořili 29 % jedinců pozorovaných na tavolnicích v Českých Budějovicích (Awad *et al.*, 2015). Endosymbiotické bakterie by tedy nemusely samce nutně zabíjet, ale mohly pouze snižovat jejich fitness a zvyšovat mortalitu během zimování. *H. axyridis* je ohledně afidofágie spíše potravní generalista (Alhmedi *et al.*, 2008), může pojídat i mery a korovnice (Hodek & Honěk, 2009; Wallace & Hain, 2000), a tak nevylíhlá samčí vajíčka nemusejí přinášet mladým samicím larvám příliš velké výhody. Naproti tomu sympatrická *Harmonia yedoensis* (Takizawa, 1917), která se živí těžko polapitelnými velkými mšicemi *Cinaria pini* (Linnaeus, 1758), vykazuje mnohem vyšší prevalenci zmíněných bakterií, protože nasycení mladých larev samic vajíčky zvyšuje schopnost nalézt vhodnou kořist (Noriyuki *et al.*, 2014). Prevalence bakterií zabíjejících samce velmi kolísá i mezi různými populacemi *H. axyridis* v původním areálu (Majerus *et al.*, 1998).

Průměrně bylo oplozených 47,1 % samic. V roce 2009 bylo při migraci průměrně oplozených 46 % samic (Nedvědová *et al.* 2013), což je téměř shodné. V Severní Karolíně (USA) bylo v roce 1993 oplozených průměrně 12 % samic a v roce 1994 průměrně 41 % samic (Nalepa *et al.*, 1996).

5.2 Tělesné rozměry a hmotnost

Samice jsou u sluněček obecně větší a těžší než samci (Smith, 1996), což odráží vyšší energetické náklady na produkci vajíček v porovnání se spermii (Hodek *et al.*, 2012; str. 85).

V souladu s obecným schématem byly samice delší a širší než samci. Tento sexuální dimorfismus je u *H. axyridis* známý (Knapp & Nedvěd, 2013; Nalepa *et al.*, 1996).

Průměrná čerstvá hmotnost samic byla přibližně 1,20 krát vyšší než samic, což jsou výsledky téměř shodné s dřívější studií české populace (asi 1,21; Nedvědová *et al.*, 2012)

a porovnatelné s čerstvě vylíhlými jedinci (1,10 až 1,20; Nedvěd & Kalushkov, 2012; Ungerová, 2010). Pons *et al.* (2015) však v listopadu před zimováním zjistili u katalánské agregace *H. axyridis* poměr průměrné hmotnosti samic a samců poněkud vyšší (1,71).

5.3 Proměnlivost sledovaných parametrů během podzimní migrace

Hmotnost s časem poklesla, nejdříve tedy migrovali jedinci, kteří již měli nastřádané zásoby na dormanci. Lehčí jedinci ještě nějakou dobu sháněli potravu, ale horší podmínky později v sezóně (nízké teploty, méně kořisti) jim už nedovolily nabýt takovou hmotnost jako dřívějším migrantům. Tyto výsledky potvrzují zjištění Nedvědové *et al.* (2013). Barron & Wilson (1998) rovněž zaznamenali vyšší hmotnost (a zvýšené přežívání) brzkých migrantů *Coccinella septempunctata* a poukázali na to, že přepnutí z „vykrmovacího“ do „migračního“ chování pravděpodobně ovlivňují jak faktory abiotické, tak faktory genetické. Slunéčka jsou podle nich schopná odhadnout svůj celkový fyziologický stav a podle toho se také zařídit.

S časem klesala i absorbance na gram čerstvé hmotnosti, takže starší červení jedinci odmigrovali na zimoviště hned, jak to šlo, mladší oranžoví k tomu dospívali později.

Domnívám se, že pokles parazitovanosti migrujících jedinců po druhém dni by se dal vysvětlit tím, že později na podzim migrovali spíše mladší oranžoví jedinci. U nich byla pravděpodobnost, že za život někdy přišli do styku s *H. virescens* (třeba při kopulaci) nižší než u starších červených jedinců. Líhnutím nové generace vysvětlují kolísání prevalence *H. virescens* u slunéček Welch *et al.* (2001).

5.4 Migrace různě melanizovaných jedinců formy *succinea*

Nízké teploty pokročilé sezóny u později se líhnoucích jedinců vyvolaly rozsáhlou melanizaci, a tak z analýz vyplynulo, že jedinci formy *succinea* s velkým rozsahem černé kresby na krovkách migrovali průměrně později na podzim než ti se středním a nízkým rozsahem černé. Tento trend již byl u *H. axyridis* popsán (Nedvědová *et al.*, 2013).

Denní doba neměla na migraci různě melanizovaných jedinců formy *succinea* signifikantní vliv. Silně melanizovaní jedinci se navzdory své schopnosti snazšího vyhřátí na slunci nelišili od oranžových jedinců aktivitou během dne.

5.5 Proměnlivost sledovaných parametrů během dne a během sezóny

Absorbance na gram čerstvé hmotnosti během dne ve 14:00 narostla, pak opět poklesla. To znamená, že ve 14:00 narostlo zastoupení starších červených jedinců.

Oplozenost samic byla průkazně nejvyšší ve 14:00, což je jen nepřímé poukázání na fakt, že ve 14:00 migrovali červenější jedinci, protože (jak popisují níže) starších červených samic bylo oplozeno signifikantně více než světlých.

Ve 14:00 ubylo samic a později jich zase přibylo. Na slunci vykazují melanická slunéčka vyšší vzrůst teploty těla než slunéčka oranžová, tento vzrůst teploty je funkcí

frakce krovek, která je zbarvená černě (Stewart & Dixon, 1989). Samice byly větší než samci (viz výše). U forem *succinea* jsou (při stejných preimaginálních podmínkách) dospělé samice na krovkách rozsáhleji melanizované než samci a tento dimorfismus je zesílený při vystavení kukel vysoké teplotě (Knapp & Nedvěd, 2013). Samice mají také rozsáhleji melanizované štíty a jejich skvrny na krovkách i štítech jsou signifikantně tmavější než skvrny samců (Bezzerrides *et al.*, 2007; Bezzerrides & Loofbourrow, 2014). Proto navrhuji, že samice mohou být nepatrně náchylnější ke škodlivému zvýšení teploty těla na přímém osvětlení a že tento jev by měl být výrazný zvláště u melanických forem. Tento jev mohl stát za úbytkem samic ve 14:00.

Ve 14:00 došlo k velkému nárůstu zastoupení červených jedinců, pak jejich zastoupení kleslo na původní hladinu. To je v souladu s výše popsáním nárůstem absorbance na gram čerstvé hmotnosti. Barvu krovek je tedy možné odhadovat subjektivně, i když například nepatrný pokles přepočtené absorbance v průběhu sezóny není vizuálně zaznamatelný – rozdíly v odstínu krovek mezi dny migrace totiž nebyly signifikantní.

5.6 Analýza barvy

Můj subjektivní odhad odstínu u forem *succinea* se ukázal jako dobře korelující s rigorózním měřením absorbancí karotenoidových extraktů z krovek. Barevné odstíny seřazené podle absorbance (= koncentrace karotenoidů v krovkách) byly: červená, oranžová, melanická a žlutá. Melaničtí jedinci tvořili směs různě starých individuí, a tak vykazovali druhou nejnižší absorbanci po žlutých jedincích. Vizuální přiřazování forem *succinea* ke starší a mladší generaci je v terénu možné bez náročnějších měření.

V absorbanci přepočtené na čerstvou hmotnost byly rozdíly ještě markantnější, výše popsané seřazení odstínů od největší absorbance k nejmenší se nezměnilo.

Potvrdila se hypotéza, že starší červené samice budou už s větší pravděpodobností oplozené. Po nich sestupně následovaly samice melanické, oranžové a žluté. Melanické samice byly tvořeny směsí různě starých individuí, a tak vykazovaly druhou nejvyšší oplozenost po červených jedincích. Nejnižší oplozenost žlutých samic je v souladu s předpokladem, že by měly být nejmladší. Vysoká oplozenost červených samic by se dala vysvětlit tím, že jsou samci preferováni před samicemi světlými. Samci se však orientují spíše olfaktoricky než vizuálně (Harmon *et al.*, 1998). Červenost krovek by také musela záviset hlavně na schopnosti vyhledávat potravu a referovat o celkovém stavu samice. Pokud platí, že migranti představují směs jedinců dvou generací a červenost krovek vypovídá o stáří jedince, docházelo by k přednostnímu páření se staršími samicemi, což by nemohlo fungovat.

I přes neprůkazné rozdíly v hmotnosti mezi kategoriemi subjektivně odhadovaného odstínu byla nejvyšší průměrná hmotnost žlutých jedinců přinejmenším zarážející vzhledem k předpokladu, že náleželi k mladší generaci a neměli tolik času na kumulaci zásob.

Melanické formy *spectabilis* a *conspicua*, které mají malý rozsah červené kresby na krovkách, měly výrazně méně karotenoidů (= absorbance na gram čerstvé hmotnosti) než forma *succinea* s velkou frakcí červené. Melanické formy se mezi sebou nelišily

signifikantně, ale pořad měla forma *spectabilis* (4 oranžové tečky) více karotenoidů než forma *conspicua* (2 oranžové tečky). To znamená, že epidermální buňky pod černým melaninem karotenoidy neukládají.

Jedinci formy *succinea* s velkou frakcí černé na krovkách měli nízkou hladinu karotenoidů, jedinci se střední frakcí černé prostřední hladinu karotenoidů a jedinci s malou frakcí černé vysokou hladinu karotenoidů. Tato posloupnost potvrzuje neukládání karotenoidů pod melanizovanou frakcí krovek a navíc naznačuje, že se pravděpodobně kumulují *in situ* v epidermis. Pokud by totiž docházelo k jejich transportu z jiných oblastí těla do krovek, očekával bych stejnou hladinu karotenoidů u různě melanizovaných jedinců formy *succinea*. Nízká hladina karotenoidů u silně melanizovaných jedinců formy *succinea* se dá vysvětlit i tím, že se líhli krátce před migrací za nižších teplot a nestačili už naakumulovat karotenoidy. To je potřeba ověřit experimentálně v laboratoři.

5.7 Detailní analýza parazitovanosti houbou *Hesperomyces virescens*

Z 1102 jedinců v celkovém vzorku bylo napadeno 26 %. Zdá se, že prevalence napříč Evropou kolísá, k lednu 2010 byla v německém Giessenu 79,1 % (Ceryngier & Twardowska, 2013). Recentně byl zaznamenán výskyt *H. virescens* na *H. axyridis* z Chorvatska (< 0,1 %; Ceryngier *et al.*, 2013) a Maďarska (< 0,1 %; Pfliegler, 2014). V některých zemích byl pozorován značný nárůst prevalence během několika let. V Belgii byla k roku 2007 méně než 0,5 %; ale roku 2011 narostla na více než 96 % (De Kesel, 2011). V Nizozemí byla prevalence *H. virescens*: 0 % v roce 2007; 0,4 % v roce 2008; 3,9 % v roce 2009; 7,2 % v roce 2010 (Haelewaters *et al.*, 2012). Podobný nárůst prevalence byl pozorován i v České republice (Nedvěd, osobní sdělení). Welch *et al.* (2001) u *Adalia bipunctata* (Linnaeus, 1758) prokázali kolísání prevalence *H. virescens* v čase i prostoru. Ostrý pokles prevalence v čase je podle nich způsoben vylíhnutím nové zdravé generace, která se teprve postupně nakazí. Dále zjistili velmi neobvyklý jev, totiž negativní závislost prevalence *H. virescens* na vzdálenosti od centra Londýna. Dynamika houbové choroby tedy nějak souvisí s mírou urbanizace. Může být asociována s vyšší teplotou v urbanizovaných oblastech, která zvyšuje pravděpodobnost překryvu generací a intergeneračního páření spojeného s přenosem houby.

Prevalence *H. virescens* byla vyšší u samců. Literatura v tomto ohledu není konzistentní. Někteří autoři zaznamenali vyšší prevalenci u samců (*H. axyridis*: léto: Garcés & Williams, 2004; zima: Nalepa & Weir, 2007; zima: Raak-van den Berg, 2014; *Chilocorus bipustulatus* (Linnaeus, 1758): léto: Applebaum *et al.*, 1971), zatímco jiní nikoli (*H. axyridis*: zima: De Kesel, 2011; léto: Raak-van den Berg, 2014; podzim a zima: Riddick & Schaefer, 2005; léto: Riddick, 2006). Mezipohlavní rozdíly v prevalenci mohou být vysvětleny vyšší aktivitou samců, kteří s větší pravděpodobností přicházejí do kontaktu se sporami (De Kesel, 2011).

Nejvíce jedinců bylo napadeno ve třetí zóně (dorzoposteriorní oblast = zadní polovina krovek). Podobný trend je známý z Rakouska u *Adalia bipunctata* (Christian, 2001), ale i z amerických studií *H. axyridis* (Garcés & Williams, 2004; Nalepa & Weir, 2007; Riddick & Schaefer, 2005; Riddick, 2006). Druhá nejčastěji napadená zóna byla šestá (ventroposteriorní oblast = ventrity a zadní polovina epipleur). Tyto dvě zóny by měly být nejčastěji napadené v případě platnosti scénáře sexuálního přenosu (Welch *et al.*,

2001; Whisler, 1968). Zbývající zóny byly napadené výrazně méně, sestupně to byly: čtvrtá, pátá, druhá a první (viz Obr. 16). Zmíněné méně často napadené zóny bývají nejspíše autoinfikovány prostřednictvím sebečištění, při němž slunéčko protahuje tělní přívěsky ústním ústrojím, tře různé tělní struktury jednou nebo více nohami a roztahuje či sbaluje křídla prvního nebo druhého páru (Valentine, 1973). Sebečištění obvykle u starších hostitelů vyúsťuje v rozšíření houby po celém jedinci (Haelewaters *et al.*, 2012).

Oplozených samic bylo napadeno průkazně více než neoplozených, takže scénář sexuálního přenosu *H. virescens* je relevantní. Nalepa & Weir (2007) zjistili podobný jev v Severní Karolíně, ale pouze u jedinců migrujících na zimoviště. Ve shodě s jejich daty ukazují relativně vysoké napadení neoplozených „panenských“ samic, které se velmi pravděpodobně nakazily při neúspěšných pokusech samců o kopulaci. Samice někdy páření odmítají, utíkají, snaží se samce setřást a ohýbají zadeček nahoru (Obata, 1988 *ex* Nalepa & Weir, 2007). Existují dva druhy odmítavého chování: prekopulační, které se obvykle dostavuje do 15 sekund po nalezení samce na samici, a přerušovaný kontakt genitálií, který nastává během dvou minut (Osawa, 1994 *ex* Nalepa & Weir, 2007).

Na samce připadal průměrně větší počet obsazených zón než na samici, lze tedy prohlásit, že u nich byla houbová infekce rozvinutější. S literaturou se toto zjištění špatně porovnává, protože jiní autoři (např. Nalepa & Weir, 2007; Riddick & Schaefer, 2005) zaznamenávali kromě distribuce alespoň přibližně také počet plodnic. Korespondence s již popsanou vyšší prevalencí u samců a se zjištěním, že zimující samci hostí více plodnic než samice (Riddick & Schaefer, 2005) je však evidentní. Samci jsou asi aktivnější než samice, navíc snad při vyhledávání partnerek mohou nechtěně vstupovat do krátkých homosexuálních interakcí, při kterých se přenesou spory ze samce na samce (Riddick, 2006).

Po druhém dni migrace kromě prosté parazitovanosti poklesl i průměrný počet obsazených zón na jednoho jedince. Později na podzim migrovali spíše mladší oranžoví jedinci (viz 5.3). U nich byla pravděpodobnost, že za život někdy přišli do styku s *H. virescens* (třeba při kopulaci) nižší než u starších červených jedinců.

Mezi barevnými formami nebyly průkazné rozdíly v průměrném počtu obsazených zón na jednoho jedince ve shodě s údaji z Nizozemí (Raak-van den Berg *et al.*, 2014). Měření viskoelastických vlastností kutikuly krovek čínských *H. axyridis* pomocí sofistikovaných metod nanoindentace (zatlačování drobného hrotu) ukázalo, že kutikula z oranžových oblastí krovek v porovnání s tou z černých oblastí je viskóznější, pohlcuje více energie, vykazuje větší obsah proteinů a je odolnější vůči praskání (Sun *et al.*, 2015). Zdá se, že germinace spor *H. virescens* však není příliš ovlivněna vlastnostmi kutikuly.

Nejvyšší průměrný počet obsazených zón měli jedinci, které jsem subjektivně označil jako červené, pak následovali oranžoví a žlutí jedinci. Červení jedinci tvořili starší generaci, která již naakumulovala spoustu karotenoidů a byla více napadená. Mladí žlutí jedinci se ještě nestihli nakazit, nebo se u nich alespoň nákaza zatím nerozšířila do více zón.

Ve prospěch scénáře sexuálního přenosu mluví kromě vyšší prevalence nákazy u oplozených samic také to, že byly průměrně napadeny ve více zónách než samice neoplozené. Samice *H. axyridis* jsou vysoce polyandrické (Awad *et al.*, 2015), vyšší počet

obsazených zón může být kromě delšího času na autoinfekci zapříčiněn interakcí s mnoha samečkami, zvláště při uvážení odmítavého chování (viz výše).

Jedinci napadení ve více zónách byli lehčí než slabě napadení jedinci. Nejvyšší průměrnou hmotnost měli jedinci napadení v jedné zóně (Tabulka 3), což se může zdát zarážející. Jedná se pouze o artefakt metodiky. Při prohlížení sluněček pod stereomikroskopem jsem totiž zónu zapsal jako parazitovanou při jakémkoli nenulovém počtu přítomných plodnic *H. virescens*. Velmi často se stávalo, že na celém jedinci byla všehovšudy jedna nebo několik málo plodnic, a to v jediné zóně. U sluněček s větším počtem napadených zón jsem typicky pozoroval shluky desítek plodnic. Je tedy evidentní, že jedinci, u nichž jsem zaznamenal jednu zónu, byli obvykle čerstvě napadení a infekce se po jejich těle zatím nerozšířila. Vyšší průměrný počet obsazených zón u červených jedinců (oproti oranžovým a žlutým) spolu s pozitivní korelací mezi počtem obsazených zón a průměrnou absorpční schopností (viz níže) jasně ukazují, že starší jedinci byli silněji napadení, pravděpodobně kvůli autoinfekci. De Kesel (1993) zaznamenal na nohou u střevlíků *Pogonus chalceus* (Marsham, 1802) ze starší generace, která představovala asi 15 % celkového vzorku, rozsáhlé napadení houbou *Laboulbenia slackensis* Cépède & Picard, 1907, proto v experimentu použil brouky mladší generace. Dosud bylo prokázáno nepatrně snížené přežívání *H. axyridis* infestovaných *H. virescens* nebo ko-infestovaných *H. virescens* a *Coccipollipus hippodamiae*, nikoli však infestovaných jen *C. hippodamiae* (Riddick, 2010). Nalepa & Weir (2007) navrhuji sníženou frekvenci páření u samic s *H. virescens*, ale hned nato poznamenávají, že jejich data se dají vysvětlit i prostou preferencí mladých samic před staršími bez ohledu na jejich napadenost. Rozdíly mezi zdravými a různě silně infikovanými jedinci nebyly v jejich studii signifikantní. Jako první na světě tedy prokazují, že silněji napadení jedinci *H. axyridis* mají nižší hmotnost. Toto zjištění může mít zásadní implikace pro biologický boj se sluněčkem. Je však třeba si uvědomit, že jsem neprováděl žádné manipulativní experimenty, a proto je třeba brát v úvahu i opačnou kauzalitu. Tedy: (i) buď jsou jedinci napadení ve více zónách lehčí, protože infekce houbou jim znesnadňuje vyhledávání potravy atd., nebo (ii) lehčí jedinci jsou nějakým způsobem náchylnější ke germinaci spor *H. virescens*, případně jsou aktivnější při páření atd.

V předchozím odstavci jsem nastínil dvě možná alternativní vysvětlení vyšší hmotnosti rozsáhle napadených jedinců. Hmotnost je obecně faktor, který se po vylíhnutí sluněčka z kukly může měnit podle dostupnosti potravy, přítomnosti parazitů atd. Ovšem strukturální velikost se po vylíhnutí z kukly pevně zafixuje a dospělý brouk po ztuhnutí kutikuly už nepoporoště ani o mikrometr, přičemž jeho velikost je determinována podmínkami, které zažil v období preimaginálního vývoje (množství potravy, vlhkost, teplota atd.; Knapp & Nedvěd, 2013). Součin délky a šířky krovek byl pro málo napadené jedince asi o 2 mm² větší než pro jedince napadené ve více zónách. To znamená, že menší (hmotnost s velikostí těsně koreluje, takže zároveň i lehčí) jedinci jsou náchylnější ke germinaci spor *H. virescens*. Zároveň se může projevit fakt, že samci, kteří jsou menší a lehčí než samice, byli napadeni silněji než samice. Vliv *H. virescens* na hmotnost sluněček samozřejmě nemohu vyloučit, ale nejspíš se jednalo o nepřímé poukázání na vyšší napadenost menších jedinců. Hedström & Monge-Nájera (1998) zaznamenali, že neotropické mouchy napadené houbou rodu *Stigmatomyces* měly signifikantně delší křídla než mouchy zdravé, což vysvětlili vyšším reprodukčním úspěchem velkých much. Jedná se o přesně opačný jev, než který zde popisují. Vyšší reprodukční úspěch menších sluněček je spíše irelevantní.

Jedinci s více obsazenými zónami vykazovali vyšší absorpenci na gram čerstvé hmotnosti. Starší jedinci tedy byli silněji napadení, což podporuje mé závěry o průběhu parazitovanosti v čase a vlivu počtu obsazených zón na hmotnost.

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti druhé a třetí zóny nebyly signifikantní. Interpretaci by komplikovala situace, kdy by vyšly rozdíly signifikantní, ale na samce by připadalo průměrně více zón než na samici. Vzhledem k tomu, že samci byli obecně napadení častěji a ve více zónách, není zde neprůkaznost podstatná. Výsledek tedy mohu interpretovat v souladu se scénářem sexuálního přenosu. Samice vlastně měly záda napadená relativně častěji.

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti páté a šesté zóny signifikantní byly a na samce připadal průměrně mnohem větší počet zón než na samici. Zjistil jsem tedy typickou distribuci plodnic indikující sexuální přenos *H. virescens*. Samice byly napadenější ve druhé a třetí zóně (= krovky bez epipleur; Obr. 16), protože při kopulaci zůstávají vespod (Obr. 8). Samci byli napadenější v páté a šesté zóně (= ventrální oblast), protože při kopulaci nalézají na samici shora a dochází tak k otírání břišní strany samce o krovky samice. Tento scénář je již vcelku dobře prokázán (Garcés & Williams, 2004; Harwood *et al.*, 2006; Riddick 2006), i když jsou známé a diskutované odchylky (De Kesel, 2011; Nalepa & Weir, 2007).

Mezipohlavní rozdíly v obsazenosti jednotlivých zón byly signifikantní pro první, čtvrtou, pátou a šestou zónu, v nichž byli samci napadenější než samice. Napadení první (= oblast kolem hlavy) a čtvrté (= nohy) zóny u samců pravděpodobně vysvětluje jejich vyšší aktivita při hledání partnerky a možnost autoinfekce.

Napadení korelovalo mezi všemi zónami, zvláště mezi čtvrtou, pátou a šestou. Korelace mezi napadením ve všech zónách ukazuje, že se infekce může rozšířit po celém jedinci kvůli autoinfekci. Zvláště významný je tento jev pro ventrální oblast (čtvrtá, pátá a šestá zóna), protože při sebečištění sluníčko protahuje tělní přívěsky ústním ústrojím a tře různé tělní struktury jednou nebo více nohama. U starších hostitelů pak dochází k rozšíření houby po celém jedinci (Haelewaters *et al.*, 2012).

5.8 Samice vyšetřené na přítomnost hlístic

Prevalence hlístic rodu *Parasitylenchus* byla 47 %, tedy nejvyšší dosud známá (Dánsko: 2 až 33 % v roce 2009; Harding *et al.*, 2011; 35 % v roce 2010; Poinar & Steenberg, 2012). Na přítomnost hlístic jsem však vyšetřil jenom samice. Ko-infekce houbou *H. virescens* a hlísticí *Parasitylenchus* se vyskytovala téměř náhodně, naproti tomu Raakvan den Berg *et al.* (2014) zjistili u jedné ze studovaných lokalit pozitivní korelaci mezi přítomností hlístice a houby.

U jedinců napadených hlísticí *Parasitylenchus* bylo v Dánsku pozorováno ztenčení tukových zásob a částečné atrofování pohlavních orgánů (Poinar & Steenberg, 2012). V kontrastu s tím jsem nezjistil vliv nákazy na hmotnost samic, i když byl výsledek nesignifikantní jen těsně ($p = 0,06$). Rovněž oplozenost nebyla pouhou přítomností hlístice ovlivněná.

Ko-infikované samice byly oproti samicím zdravým nebo infikovaným jen houbou či hlísticí všechny oplozené, měly vyšší hmotnost a více karotenoidů v krovkách. To znamená, že starší samice déle strádaly zásoby a akumulovaly karotenoidy. Také byly s větší pravděpodobností už oplozené a parazitované.

6. Shrnutí a přínosy práce

Nejdůležitější z jinde dosud nepopsaných poznatků, které v této práci prezentuji, jsou:

1. Slunéčka rozsáhleji napadená houbou *H. virescens* mají nižší hmotnost než slunéčka zdravá či napadená jen slabě. To je způsobeno tím, že menší jedinci jsou náchylnější ke germinaci spor zmíněné houby.
2. Pod černými tečkami (či vzorem) na krovkách slunéček se neukládají červené karotenoidy. Představa, že základní barva krovek je červená a pouze místy zakrytá melanizovanou kutikulou, je tedy chybná.

Slunéčko východní bylo vysazováno na biologickou ochranu rostlin. Před sto lety by asi nikoho nenapadlo, že se lavinovitě rozšíří po celém světě a stane se jedním z nejznámějších invazních druhů. Role, kterou hraje v potlačování různých škůdců, zůstává i dnes nedocenitelná. Jeho hemolymfa by mohla poskytnout nová účinnější antibiotika. Na podzim naletuje do domácností a znečišťuje interiéry. Vyskytují se na něj alergie, může představovat hrozbu pro původní biodiverzitu a ovlivňuje chuť vína.

Abychom mohli předvídat či předcházet podobným „nehodám“, jako bylo rozšíření slunéčka východního, je zásadní perfektně porozumět všem aspektům jeho biologie. Když už se něco podobného stane, je nutné zvládnout minimalizaci negativních dopadů a maximalizaci všech možných benefitů. Proto je například důležité porovnávat vlastnosti invazní a původní asijské populace nebo zkoumat parazity a jejich potenciální využití v biologickém boji.

Výsledky této práce budou publikovány jako součást vědeckého článku s celosvětovým kolektivem autorů vedeným Dr. Dannym Haelewatersem z Harvardovy univerzity ve speciálním čísle mezinárodního impaktovaného časopisu *BioControl*. V současné době (17.3. 2016) prochází článek procesem *peer review*.

HAELEWATERS, D.; Zhao, S. Y.; Cottrell, T. E.; De Kesel, A.; Fiedler, L.; Herz, A.; Hesketh, H.; Hui, C.; Kleespies, R. G.; Losey, J. E.; Murray, K. M.; Nedvěd, O.; Pfliegler, W. P.; Raak-van den Berg, C. L.; Riddick, E. W.; Shapiro-Ilan, D. I.; Smyth, R. R.; Steenberg, T.; van Wieling, P. S.; Veglášová, S.; Zhao, Z.; Ceryngier, P.; Roy, H. E. Parasites of *Harmonia axyridis*: current research and perspectives. *BioControl*, 2016, ??

7. Seznam zkratk

ANOVA	analýza variance (<i>analysis of variance</i>)
BL3	třetí kategorie Černého seznamu
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DMMP	2,5-dimethyl-3-methoxypyrazin
EICA	hypotéza evoluce zvýšené konkurenční schopnosti (<i>the evolution of increased competitive ability hypothesis</i>)
ERH	hypotéza úniku od nepřátel (<i>the enemy release hypothesis</i>)
IAS	invazní druh (<i>invasive alien species</i>)
IBMP	2-isobutyl-3-methoxypyrazin
IPMP	2-isopropyl-3-methoxypyrazin
LSD	Fischerův LSD (<i>least significant difference</i>) test; nezaměňovat s diethylamidem kyseliny lysergové (<i>lysergic acid diethylamide</i>)
MRSA	methicilin-rezistentní zlatý stafylokok (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SBMP	2-sek-butyl-3-methoxypyrazin
SE	střední chyba průměru (<i>standard error of the mean</i>)
STD	pohlavně přenosná choroba (<i>sexually transmitted disease</i>)
USA	Spojené státy americké (<i>United States of America</i>)

8. Seznam literary

- ABEL, Steven-Alan G.; Olivier, W. J.; Pederson, R. L.; Bissember, A. C.; & Smith, J. A. Complete stereocontrol in the synthesis of harmonine and novel analogues facilitated by a Grubbs Z-selective cross-metathesis catalyst. *Australian Journal of Chemistry*, 2016, 68.12: 1815-1820.
- ADRIAENS, Tim; SAN MARTIN, Gilles; MAES, Dirk. Invasion history, habitat preferences and phenology of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* in Belgium. *BioControl*, 2008, 53.1: 69-88.
- ALAM, Naseer; Choi, I. S.; Song, K. S.; Hong, J.; Lee, C. O.; & Jung, J. H. A new alkaloid from two coccinellid beetles *Harmonia axyridis* and *Aiolocaria hexaspilota*. *Bulletin-Korean Chemical Society*, 2002, 23.3: 497-499.
- ALHMEDI, Ammar; HAUBRUGE, Eric; FRANCIS, Frédéric. Role of prey-host plant associations on *Harmonia axyridis* and *Episyrphus balteatus* reproduction and predatory efficiency. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2008, 128.1: 49-56.
- ALTINCICEK, Boran; KOVACS, Jennifer L.; GERARDO, Nicole M. Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biology letters*, 2012, 8.2: 253-257.
- AMEIXA, O. M. C. C., Honěk, A.; Martínková, Z.; & Kindlmann, P. Position of *Harmonia axyridis* in aphidophagous guilds in the Czech Republic. *IOBC/WPRS Bulletin*, 2010, 58: 7-14.
- APPLEBAUM, S. W.; Kfir, R.; Gerson, U.; & Tadmor, U. Studies on the summer decline of *Chilocorus bipustulatus* in citrus groves of Israel. *Entomophaga*, 1971, 16.4: 433-444.
- AWAD, Mona; Laugier, G. J.; Loiseau, A.; & Nedvěd, O. Unbalanced polyandry in wild-caught ladybirds *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied Entomology and Zoology*, 2015, 50.4: 427-434.
- BALDAUF, Sandra L. A search for the origins of animals and fungi: comparing and combining molecular data. *The american naturalist*, 1999, 154.S4: S178-S188.
- BARRON, Awonew; WILSON, Kenneth. Overwintering survival in the seven spot ladybird, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 1998, 95: 639-642.

- BÁTHORI, Ferenc; CSATA, Enikő; TARTALLY, András. *Rickia wasmannii* increases the need for water in *Myrmica scabrinodis* (Ascomycota: Laboulbeniales; Hymenoptera: Formicidae). *Journal of invertebrate pathology*, 2015, 126: 78-82.
- BAZZOCCHI, Giovanni G.; Lanzoni, A.; Accinelli, G. & Burgio, G. Overwintering, phenology and fecundity of *Harmonia axyridis* in comparison with native coccinellid species in Italy. *BioControl*, 2004, 49.3: 245-260.
- BELYAKOVA, N. A. Polymorphism of the harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) Baikal population. *Entomological review*, 2013, 93.1: 50-55.
- BEZZERIDES, Alexander L.; McGraw, K. J.; Parker, R. S.; & Hussein, J. Elytra color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2007, 61.9: 1401-1408.
- BEZZERIDES, Alexander L.; LOOFBOURROW, Seth A. Melanic facial patterns and their significance in the multicolored Asian lady beetle (*Harmonia axyridis*). *The American midland naturalist*, 2014, 172.2: 366.
- BIOLOGICAL CONTROL. *Elsevier*. [online]. 2015 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://www.journals.elsevier.com/biological-control/>
- BLOSSEY, Bernd; NOTZOLD, Rolf. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 1995, 83.5: 887-889.
- BLOUNT, Jonathan D.; Rowland, H. M.; Drijfhout, F. P.; Endler, J. A.; Inger, R.; Sloggett, J. J.; Hurst, G. D. D.; Hodgson, D. J.; & Speed, M. P. How the ladybird got its spots: effects of resource limitation on the honesty of aposematic signals. *Functional Ecology*, 2012, 26.2: 334-342.
- BRAKEFIELD, Paul M. Ecological studies on the polymorphic ladybird *Adalia bipunctata* in the Netherlands. I. Population biology and geographical variation of melanism. *The Journal of Animal Ecology*, 1984, 761-774.
- BRITTON, George; Goodwin, T. W.; Harriman, G. E.; & Lockley, W. J. Carotenoids of the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochemistry*, 1977, 7.4: 337-345.

- BROWN, Peter M. J.; Adriaens, T.; Bathon, H.; Cuppen, J.; Goldarazena, A.; Hägg, T.; Kenis, M.; Klausnitzer, B. E. M.; Kovář, I.; Loomans, A. J. M.; Majerus, M. E. N.; Nedvěd, O.; Pedersen, J.; Rabitsch, W.; Roy, H. E.; Ternois, V.; Zakharov, I. A.; & Roy, D. B. *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *BioControl*, 2008, 53.1: 5-21.
- BROWN, Peter M. J.; Thomas, C. E.; Lombaert, E.; Jeffries, D. L.; Estoup, A.; & Handley, L. J. L. The global spread of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): distribution, dispersal and routes of invasion. *BioControl*, 2011, 56.4: 623-641.
- CAI, Lingshuang; KOZIEL, Jacek A.; O'NEAL, Matthew E. Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1147.1: 66-78.
- CERYNGIER, Piotr; Romanowski, J.; Szymańska, J.; Galanciak, M.; Bardzińska, M.; & Romanowski, M. Population of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) from Pelješac Peninsula, southern Croatia. *Studia Ecologiae et Bioethicae*, 2013, 11.4: 79-91.
- CERYNGIER, Piotr; ROY, Helen E.; POLAND, Remy L. Natural enemies of ladybird beetles. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Blackwell, Chichester, 2012, 375-443.
- CERYNGIER, Piotr; TWARDOWSKA, Kamila. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) as a host of the parasitic fungus *Hesperomyces virescens* (Ascomycota: Laboulbeniales, Laboulbeniaceae): A case report and short review. *European Journal of Entomology*, 2013, 110.4: 549.
- COBBS, Cassidy; Heath, J.; Stireman, J. O. 3rd; & Abbot, P. Carotenoids in unexpected places: gall midges, lateral gene transfer, and carotenoid biosynthesis in animals. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2013, 68.2: 221-228.
- COLAUTTI, Robert I.; Ricciardi, A.; Grigorovich, I. A.; & MacIsaac, H. J. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis?. *Ecology Letters*, 2004, 7.8: 721-733.
- COTTRELL, Ted E.; RIDDICK, Eric W. Limited transmission of the ectoparasitic fungus *Hesperomyces virescens* between lady beetles. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012, 7.

- CUDJOE, Erasmus; WIEDERKEHR, Tara B.; BRINDLE, Ian D. Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst*, 2005, 130.2: 152-155.
- DE KESEL, André. Hesperomyces (Laboulbeniales) and coccinellid hosts. *Sterbeeckia*, 2011, 30: 32-37.
- DOBZHANSKY, Theodosius. Geographical variation in lady-beetles. *American naturalist*, 1933, 97-126.
- DOLENSKÁ, Michaela; Nedvěd, O.; Veselý, P.; Tesařová, M.; & Fuchs, R. What constitutes optical warning signals of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) towards bird predators: colour, pattern or general look?. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2009, 98.1: 234-242.
- DURIEUX, Delphine; Fassotte, B.; Vanderplanck, M.; Brostaux, Y.; Fischer, C.; Lognay, G.; Haubruge, E.; & Verheggen, F. J. Is conspecific substrate marking a long-term external memory of previously colonized overwintering sites in *Harmonia axyridis*?. *Journal of applied entomology*, 2014, 138.5: 338-345.
- DURIEUX, Delphine; Fischer, C.; Brostaux, Y.; Sloggett, J. J.; Deneubourg, J. L.; Vandereycken, A.; Joie, E.; Wathletet, J. P.; Lognay, G.; Haubruge, E.; & Verheggen, F. J. Role of long-chain hydrocarbons in the aggregation behaviour of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of insect physiology*, 2012, 58.6: 801-807.
- DURIEUX, Delphine; Fassotte, B.; Vanderplanck, M.; Deneubourg, J. L.; Fischer, C.; Lognay, G.; Haubruge, E.; & Verheggen, F. J. Substrate marking by an invasive ladybeetle: Seasonal changes in hydrocarbon composition and behavioral responses. *PloS one*, 2013, 8.4: e61124.
- ESTOUP, Arnaud; GUILLEMAUD, Thomas. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what?. *Molecular Ecology*, 2010, 19.19: 4113-4130.
- FACON, Benoît; Crespin, L.; Loiseau, A.; Lombaert, E.; Magro, A.; & Estoup, A. Can things get worse when an invasive species hybridizes? The harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in France as a case study. *Evolutionary applications*, 2011, 4.1: 71-88.

- FISCHER, Christophe; Heuskin, S.; Laurent, P.; Marlet, C.; Durieux, D.; Verheggen, F.; & Lognay, G. Harmonia axyridis (Pallas) secondary metabolites quantification in relation with aposematism: Part I: Harmonine quantification. In: *Eleventh International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography (HTC-11)*. 2010.
- FLINT, Mary Louise; DREISTADT, Steve H.; CLARK, Jack Kelly. *Natural enemies handbook: the illustrated guide to biological pest control*. Univ of California Press, 1998.
- GARCÉS, Sandra; WILLIAMS, Roger. First record of Hesperomyces virescens Thaxter (Laboulbeniales: Ascomycetes) on Harmonia axyridis (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 2004, 77.2: 156-158.
- GARNAS, Jeff R., Auger-Rozenberg, M. A.; Roques, A.; Bertelsmeier, C.; Wingfield, M. J.; Saccaggi, D. L.; Roy, H. E., & Slippers, B. Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *Biological Invasions*, 2016, 1-18.
- GEMENO, César; ZUREK, Ludek; SCHAL, Coby. Control of Herpomycetes spp.(Ascomycetes: Laboulbeniales) infection in the wood cockroach, Parcoblatta lata (Dictyoptera: Blattodea: Blattellidae), with benomyl. *Journal of invertebrate pathology*, 2004, 85.2: 132-135.
- GOETZ, David W. Harmonia axyridis ladybug invasion and allergy. In: *Allergy and Asthma Proceedings*. OceanSide Publications, Inc, 2008. p. 123-129.
- GORDON, Robert D. The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. *Journal of the New York Entomological Society*, 1985, 93.1.
- GRILL, Christopher P.; MOORE, Allen J. Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologia*, 1998, 114.2: 274-282.
- GUILFORD, Tim. The evolution of conspicuous coloration. *American Naturalist*, 1988, S7-S21.
- HAELEWATERS, Danny; Comont, R. F.; Zhao, S. Y.; & Pfister, D. H. Hesperomyces virescens (Fungi, Ascomycota, Laboulbeniales) attacking Harmonia axyridis (Coleoptera, Coccinellidae) in its native range. *Chinese Science Bulletin*, 2014, 59.5-6: 528-532.

- HAELEWATERS, Danny; Zhao, S. Y.; De Kesel, A.; Handlin, R. E.; Royer, I. R.; Farrell, B. D.; & Pfister, D. H. Laboulbeniales (Ascomycota) of the Boston Harbor Islands I: species parasitizing Coccinellidae and Staphylinidae, with comments on typification. *Northeastern Naturalist*, 2015, 22.3: 459-477.
- HAELEWATERS, Danny; van Wielink, P.; van Zuijlen, J. W.; Verbeken, A.; & De Kesel, A. New records of Laboulbeniales (Fungi, Ascomycota) for the Netherlands. *Entomol. Ber.*, 2012, 72: 175-183.
- HAELEWATERS, Danny; Zhao, S. Y.; Cottrell, T. E.; De Kesel, A.; Fiedler, L.; Herz, A.; Hesketh, H.; Hui, C.; Kleespies, R. G.; Losey, J. E.; Murray, K. M.; Nedvěd, O.; Pfliegler, W. P.; Raak-van den Berg, C. L.; Riddick, E. W.; Shapiro-Ilan, D. I.; Smyth, R. R.; Steenberg, T.; van Wieling, P. S.; Veglášová, S.; Zhao, Z.; Ceryngier, P.; Roy, H. E. Parasites of *Harmonia axyridis*: current research and perspectives. *BioControl*, 2016, in press
- HAELEWATERS, Danny; PFISTER, Donald H. Cryptic diversity in the *Hesperomyces virescens* species complex (Ascomycota, Laboulbeniomycetes, Laboulbeniales). *Joint International Conference „Botany 2015“*, Edmonton, Alberta, Canada, 2015
- HARDING, Susanne; Poinar Jr. G. O.; Dimitrova, D. V.; & Steenberg, T. *Parasitylenchus* sp. (Tylenchomorpha: Allantonematidae) parasitizing field populations of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 2011, 108.3: 487.
- HARMON, Jason P.; LOSEY, John E.; IVES, A. R. The role of vision and color in the close proximity foraging behavior of four coccinellid species. *Oecologia*, 1998, 115.1-2: 287-292.
- HARWOOD, James D.; Ricci, C.; Romani, R.; Pitz, K. M.; Weir, A.; & Obrycki, J. J. Prevalence and association of the laboulbenialean fungus *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) on coccinellid hosts (Coleoptera: Coccinellidae) in Kentucky, USA. *European Journal of Entomology*, 2006, 103.4: 799-804.
- HAULOTTE, Eveline; LAURENT, Pascal; BRAEKMAN, Jean-Claude. Biosynthesis of defensive Coccinellidae alkaloids: Incorporation of fatty acids in adaline, coccinelline, and harmonine. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012.10: 1907-1912.
- HEDSTRÖM, Ingemar; MONGE-NÁJERA, Julián. Is sexually transmitted fungal infection evidence for size-related mating success in Neotropical guava fruit flies?. *Revista de biología tropical*, 1998, 46.4: 1131-1134.

- HODEK, Ivo. *Biology of Coccinellidae: With keys for identification of larvae by co-authors*. Prague: Academia, 1973.
- HODEK, Ivo. Diapause/dormancy. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Blackwell, Chichester, 2012, 275-342.
- HODEK, Ivo; HONĚK, Alois. Scale insects, mealybugs, whiteflies and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) as prey of ladybirds. *Biological Control*, 2009, 51.2: 232-243.
- HUELSMAN, M. F.; Kovach, J.; Jasinski, J.; Young, C.; & Eisley, B. Multicolored Asian lady beetle (*Harmonia axyridis*) as a nuisance pest in households in Ohio. In: *Proceedings of 4th international conference on urban pests*. In Jones, 2002. p. 243-250.
- HURST, Gregory D. D.; MAJERUS, Michael E. N. Why do maternally inherited microorganisms kill males?. *Heredity*, 1993, 71.1: 81-95.
- CHRISTIAN, Erhard. The coccinellid parasite *Hesperomyces virescens* and further species of the order Laboulbeniales (Ascomycotina) new to Austria. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie*, 2001, 599-603.
- IABLOKOFF-KHNZORIAN, Stefane Mironovitch; GRASSÉ, Pierre-Paul. *Les coccinelles: coléoptères-coccinellidae: tribu Coccinellini des régions Paléartictique et orientale*. Boubée, 1982.
- INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. *Invasive Species*. [online]. 15.2.2011 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: http://www.iucn.org/about/union/secretariat/offices/iucnmed/iucn_med_programme/species/invasive_species/
- KAJITA, Yukie; Obrycki, J. J.; Sloggett, J. J.; & Haynes, K. F. Intraspecific alkaloid variation in ladybird eggs and its effects on con- and hetero-specific intraguild predators. *Oecologia*, 2010, 163.2: 313-322.
- KAMBUROV, S. S.; NADEL, D. J.; KENNETH, R. Observations on *Hesperomyces virescens* Thaxter (Laboulbeniales) a fungus associated with premature mortality of *Chilocorus bipustulatus* L. in Israel. *Israel Journal of Agricultural Research*, 1967, 17.2: 131-134.

- KATSOYANNOS, P.; Kontodimas, D. C.; Stathas, G. J.; & Tsartsalis, C. T. Establishment of *Harmonia axyridis* on Citrus and Some Data on Its Phenology in Greece. *Phytoparasitica*, 1997, 25.3: 183-191.
- KEHAT, M.; GREENBERG, S.; GORDON, D. Factors causing seasonal decline in *Chilocorus bipustulatus* L. [Coccinellidae] in citrus groves in Israel. *Entomophaga*, 1970, 15.4: 337-345.
- KENIS, Marc; Roy, H. E.; Zindel, R.; & Majerus, M. E. N. Current and potential management strategies against *Harmonia axyridis*. In: *From Biological Control to Invasion: the Ladybird Harmonia axyridis as a Model Species*. Springer Netherlands, 2007. p. 235-252.
- KNAPP, Michal; NEDVĚD, Oldřich. Gender and timing during ontogeny matter: effects of a temporary high temperature on survival, body size and colouration in *Harmonia axyridis*. *PloS one*, 2013, 8.9: e74984.
- KNELL, Robert J.; WEBBERLEY, K. Mary. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biological Reviews*, 2004, 79.03: 557-581.
- KÖGEL, Susanne; Eben, A.; Hoffmann, C.; & Gross, J. Influence of diet on fecundity, immune defense and content of 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of chemical ecology*, 2012, 38.7: 854-864.
- KOCH, R. L. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of insect Science*, 2003, 3.1: 32.
- KOCH, R. L.; Burkness, E. C.; Burkness, S. W.; & Hutchison, W. D. Phytophagous preferences of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) for autumn-ripening fruit. *Journal of Economic Entomology*, 2004, 97.2: 539-544.
- KOMAI, Taku; CHINO, Mitsushigé; HOSINO, Yasusi. Contributions to the evolutionary genetics of the lady-beetle, *Harmonia*. I. Geographic and temporal variations in the relative frequencies of the elytral pattern types and in the frequency of elytral ridge. *Genetics*, 1950, 35.5: 589.
- KOMÁREK, Stanislav. *Mimikry, aposematismus a příbuzné jevy: mimetismus v přírodě a vývoj jeho poznání*. 2. vydání v českém jazyce, V nakladatelství Dokořán 1. Ilustrace Karel Stibral. Praha: Dokořán, 2004. ISBN 80-86569-72-1.

- LOMBAERT, Eric; Guillemaud, T.; Cornuet, J. M.; Malausa, T.; Facon, B.; & Estoup, A. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. *PloS one*, 2010, 5.3: e9743.
- LOMBAERT, Eric; Guillemaud, T.; Lundgren, J.; Koch, J.; Facon, B.; Grez, A.; Loomans, A.; Malausa, T.; Nedvěd, O.; Rhule E.; Staverlokk, A.; Steenberg, T.; & Estoup, A. Complementarity of statistical treatments to reconstruct worldwide routes of invasion: the case of the Asian ladybird *Harmonia axyridis*. *Molecular ecology*, 2014, 23.24: 5979-5997.
- MÁČA, Jan. Zapomenuté houby: roztřepenky. *Vesmír*. Praha: Vesmír s.r.o., 2003: 637-641, ISSN 1214-4029.
- MAJERUS, Michael E. N., *Ladybirds*. London [etc.]: HarperCollins, 1994. ISBN 0002199351.
- MAJERUS, Michael E. N.; HURST, G. D. D. Ladybirds as a model system for the study of male-killing symbionts. *Entomophaga*, 1997, 42.1-2: 13-20.
- MAJERUS, Michael E. N. *Sex wars: genes, bacteria, and biased sex ratios*. Princeton University Press, 2003.
- MAJERUS, Tamsin M. O.; Majerus, M. E. N.; Knowles, B.; Wheeler, J.; Bertrand, D.; Kuznetsov, V. N.; Ueno, H.; & Hurst, G. D. D. Extreme variation in the prevalence of inherited male-killing microorganisms between three populations of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Heredity*, 1998, 81.6: 683-691.
- MAJERUS, Tamsin M. O.; Graf von der Schulenburg, J. H.; Majerus, M. E. N.; Hurst, G. D. D. Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Insect molecular biology*, 1999, 8.4: 551-555.
- MCCORNACK, B. P.; KOCH, R. L.; RAGSDALE, D. W. A simple method for in-field sex determination of the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis*. *Journal of Insect Science*, 2007, 7.1: 10.
- MCCUTCHEON, T. W.; SCOTT, H. R. Observations of cosmetic damage on a house caused by the multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *West Virginia University Extension Service* (<http://www.wvu.edu/~agexten/ipm/insects/beetle.pdf>), 2001.

- MICHIE, L. J.; Mallard, F.; Majerus, M. E. N.; & Jiggins, F. M. Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*. *Journal of evolutionary biology*, 2010, 23.8: 1699-1707.
- MORAN, Nancy A.; JARVIK, Tyler. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science*, 2010, 328.5978: 624-627.
- MOSER, Susan E.; OBRYCKI, John J. Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of coccinellid larvae related to zoophytophagy. *Biological Control*, 2009, 51.3: 487-492.
- NAGEL, Nadja C.; Masic, A.; Schurigt, U.; & Boland, W. Efficient synthesis of (R)-harmonine-the toxic principle of the multicolored Asian lady beetle (*Harmonia axyridis*). *Organic & biomolecular chemistry*, 2015, 13.18: 5139-5146.
- NALEPA, Christine A.; KENNEDY, G. G.; BROWNIE, C. Role of visual contrast in the alighting behavior of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) at overwintering sites. *Environmental entomology*, 2005, 34.2: 425-431.
- NALEPA, Christine A.; KIDD, K. A.; AHLSTROM, K. R. Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. *Annals of the Entomological Society of America*, 1996, 89.5: 681-685.
- NALEPA, Christine A.; WEIR, Alexander. Infection of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) by *Hesperomyces virescens* (Ascomycetes: Laboulbeniales): role of mating status and aggregation behavior. *Journal of invertebrate pathology*, 2007, 94.3: 196-203.
- NEDVĚD, Oldřich; Kalushkov, P.; Fois, X.; Ungerová, D.; Rozsypalová, A.; Babendreier, D.; Aebi, A.; Kenis, M.; & Roy, H. E. *Harmonia axyridis*: six-legged alligator or lethal fugu?. *IOBC/wprs Bulletin*, 2010, 58: 65-68.
- NEDVĚD, Oldřich. *Brouci čeledi slunéčkovití (Coccinellidae) střední Evropy: Ladybird beetles (Coccinellidae) of Central Europe*. Vydání 1. Praha: Academia, 2015. Zoologické klíče. ISBN 978-80-200-2495-4.
- NEDVĚD, Oldřich. Jak se dělá tečkování u slunéček. *Živa*. Praha: Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR, v. v. i., 1/2011: 34-37, ISSN 0044-4812.
- NEDVĚD, Oldřich. *Slunéčko východní (Harmonia axyridis) - pomocník v biologické ochraně nebo ohrožení biodiverzity?: certifikovaná metodika v praxi*. 2. doplň. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, c2014. ISBN 978-80-7394-490-2.

- NEDVĚD, Oldřich. Štěrbínový lapač pro odchyt létajícího hmyzu. Úřad průmyslového vlastnictví. Užité vzor 25484, 2013
- NEDVĚD, Oldřich; HONĚK, Alois. Life History and Development. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Blackwell, Chichester, 2012, 54-109.
- NEDVĚD, Oldřich; KALUSHKOV, Plamen. Effect of air humidity on sex ratio and development of ladybird *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.
- NEDVĚDOVÁ, Tereza; Awad, M.; Ungerová, D.; & Nedvěd, O. Characteristics of ladybird *Harmonia axyridis* during autumn migration. *IOBC Bulletin*, 2013, 94: 117-122.
- NEEDHAM, Arthur E. *The significance of zoochromes*. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1974. ISBN 3-540-06331-5.
- NEI, Masatoshi; MARUYAMA, Takeo; CHAKRABORTY, Ranajit. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1975, 1-10.
- NORIYUKI, Suzuki; KAMEDA, Yuichi; OSAWA, Naoya. Prevalence of male-killer in a sympatric population of two sibling ladybird species, *Harmonia yedoensis* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 2014, 111.2: 307.
- OBATA, Shohko. Mating refusal and its significance in females of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Physiological entomology*, 1988, 13.2: 193-199.
- ORLOVA-BIENKOWSKAJA, Marina J.; UKRAINSKY, Andrey S.; BROWN, Peter M. J. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Asia: a re-examination of the native range and invasion to southeastern Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Biological Invasions*, 2015, 17.7: 1941-1948.
- OSAWA, Naoya. The occurrence of multiple mating in a wild population of the ladybird beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Ethology*, 1994, 12.1: 63-66.
- OSAWA, Naoya; NISHIDA, Takayoshi. Seasonal variation in elytral colour polymorphism in *Harmonia axyridis* (the ladybird beetle): the role of non-random mating. *Heredity*, 1992, 69.4: 297-307.

- PANIGAJ, Lubomír; Zach, P.; Honěk, A.; Nedvěd, O.; Kulfan, J.; Martínková, Z.; Selyemová, D.; Viglášová, S.; & Roy, H. E. The invasion history, distribution and colour pattern forms of the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) in Slovakia, Central Europe. *ZooKeys*, 2014, 412: 89.
- PERGL, Jan; Sádlo, J.; Petrusek, A.; Laštůvka, Z.; Musil, J.; Perglová, I.; Šanda, R.; Šefrová, H.; Šíma, J.; Vohralík, V.; & Pyšek, P. Black, Grey and Watch Lists of alien species in the Czech Republic based on environmental impacts and management strategy. *NeoBiota*, 2016, 28: 1.
- PETTERSSON, Jan. Coccinellids and Semiochemicals. *Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae)*: Blackwell, Chichester, 2012, 444-464.
- PFLIEGLER, Walter P. First Hungarian record of the fungus *Hesperomyces virescens* (Ascomycota: Laboulbeniales), parasitic on the harlequin ladybird.
- PHILKHANA, Satish C.; Dhasaiyan, P.; Prasad, B. L. V.; & Reddy, D. S. Access to harmonine, a chemical weapon of ladybird beetles. *RSC Advances*, 2014, 4.58: 30923-30926.
- PICKERING, Gary; Lin, J.; Riesen, R.; Reynolds, A.; Brindle, I.; & Soleas, G. Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2004, 55.2: 153-159.
- POINAR, George O. J.; STEENBERG, Tove. Parasitylenchus *bifurcatus* n. sp. (Tylenchida: Allantonematidae) parasitizing *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasite Vector*, 2012, 5:218
- PONS, Xavier; Roca, M.; Lumbierres, B.; & Lucas, É. Characterization of a newly established aggregation of the invasive ladybeetle *Harmonia axyridis* and current status of the invader in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2015, 13.2: 1006.
- POULTON, Edward Bagnall. *The colours of animals: their meaning and use, especially considered in the case of insects*. D. Appleton, 1890.
- PRICE, Trevor D.; QVARNSTRÖM, Anna; IRWIN, Darren E. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2003, 270.1523: 1433-1440.
- PRŮCHOVÁ, Alexandra; Nedvěd, O.; Veselý, P.; Ernestová, B.; & Fuchs, R. Visual warning signals of the ladybird *Harmonia axyridis*: the avian predators' point of view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2014, 151.2: 128-134.

- RAAK-VAN DEN BERG, C. Lidwien; van Wielink, P. S.; de Jong, P. W.; Gort, G.; Haelewaters, D.; Helder, J.; & van Lenteren, J. C. Invasive alien species under attack: natural enemies of *Harmonia axyridis* in the Netherlands. *BioControl*, 2014, 59.2: 229-240.
- RAAK-VAN DEN BERG, C. Lidwien; Stam, J. M.; De Jong, P. W.; Hemerik, L.; & Van Lenteren, J. C. Winter survival of *Harmonia axyridis* in the Netherlands. *Biological Control*, 2012, 60.1: 68-76.
- RIDDICK, Eric W. Influence of host gender on infection rate, density and distribution of the parasitic fungus, *Hesperomyces virescens*, on the multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*. *Journal of Insect Science*, 2006, 6.1: 42.
- RIDDICK, Eric W.; SCHAEFER, P. W. Occurrence, density, and distribution of parasitic fungus *Hesperomyces virescens* (Laboulbeniales: Laboulbeniaceae) on multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 2005, 98.4: 615-624.
- RIDDICK, Eric W. Ectoparasitic mite and fungus on an invasive lady beetle: parasite coexistence and influence on host survival. *Bulletin of Insectology*, 2010, 63.1: 13-20.
- RÖHRICH, Christian R.; Ngwa, C. J.; Wiesner, J.; Schmidtberg, G.; Degenkolb, T.; Kollwe, C.; Fischer, R.; Pradel, G.; & Vilcinskis, A. Harmonine, a defence compound from the harlequin ladybird, inhibits mycobacterial growth and demonstrates multi-stage antimalarial activity. *Biology letters*, 2012, 8.2: 308-311.
- ROY, Helen E.; Handley, L. J. L.; Schönrogge, K.; Poland, R. L.; & Purse, B. V. Can the enemy release hypothesis explain the success of invasive alien predators and parasitoids?. *BioControl*, 2011, 56.4: 451-468.
- ROY, Helen E.; Adriaens, T.; Isaac, N. J. B.; Kenis, M.; Onkelinx, T.; San Martin, G.; Brown, P. M. J.; Hautier, L.; Poland, R.; Roy, D. B.; Comont, R.; Eschen, R.; Frost, R.; Zindel, R.; Van Vlaenderen, J.; Nedvěd, O.; Ravn, H. P.; Grégoire, J. C.; de Biseau, J. C.; & Maes, D. Invasive alien predator causes rapid declines of native European ladybirds. *Diversity and Distributions*, 2012, 18.7: 717-725.
- ROY, Helen E.; Rhule, E.; Harding, S.; Handley, L. J. L.; Poland, R. L.; Riddick, E. W.; & Steenberg, T. Living with the enemy: parasites and pathogens of the ladybird *Harmonia axyridis*. *BioControl*, 2011, 56.4: 663-679.

- SANTAMARIA, S.; Laboulbeniales, I. Laboulbenia. *Flora Mycologica Iberica* 4, J. Cramer, Madrid, Berlin, Stuttgart, 1998.
- SATO, Satoru; KUSHIBUCHI, Kohei; YASUDA, Hironori. Effect of reflex bleeding of a predatory ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), as a means of avoiding intraguild predation and its cost. *Applied Entomology and Zoology*, 2009, 44.2: 203-206.
- SCOTT, K. John. Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001.
- SCHMIDTBERG, Henrike; Röhrich, C.; Vogel, H.; & Vilcinskas, A. A switch from constitutive chemical defence to inducible innate immune responses in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Biology letters*, 2013, 9.3: 20130006.
- SCHOCH, Conrad L.; Sung, G. H.; López-Giráldez, F.; Townsend, J. P.; Miadlikowska, J.; Hofstetter, V.; Robbertse, B.; Matheny, P. B.; Kauff, F.; Wang, Z.; Gueidan, C.; Andrie, R. M.; Trippe, K.; Ciuffetti, L. M.; Wynns, A.; Fraker, E.; Hodkinson, B. P.; Bonito, G.; Groenewald, J. Z.; Arzanlou, M.; de Hoog, G. S.; Crous, P. V.; Hewitt, D.; Pfister, D. H.; Peterson, K.; Gryzenhout, M.; Wingfield, M. J.; Aptroot, A.; Suh, S. O.; Blackwell, M.; Hillis, D. M.; Griffith, G. V.; Castlebury, L. A.; Rossmann, A. Y.; Lumbsch, H. T.; Lücking, R.; Büdel, B.; Rauhut, A.; Diederich, P.; Ertz, D.; Geisser, D. M.; Hossaka, K.; Inderbitzin, P.; Kohlmeyer, J.; Volkmann-Kohlmeyer, B.; Mostert, L.; O'Donnell, K.; Sipman, H.; Rogers, J. D.; Shoemaker, R. A.; Sugiyama, J.; Summerbell, R. C.; Untereiner, W.; Johnston, P. R.; Stenroos, S.; Zuccaro, A.; Dyer, P. S.; Crittenden, P. D.; Cole, M. S.; Hansen, K.; Trappe, J. M.; Yahr, R.; Lutzoni, F.; & Spatafora, J. W. The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic biology*, 2009, 58: 224-239
- SLOAN, Daniel B.; MORAN, Nancy A. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies. *Biology letters*, 2012, 8.6: 986-989.
- SLOGGETT, John J. Predation of ladybird beetles by the orb-web spider *Araneus diadematus*. *BioControl*, 2010, 55.5: 631-638.
- SLOGGETT, John J. Weighty matters: body size, diet and specialization in aphidophagous ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 2008, 105.3: 381.
- SLOGGETT, John J.; Magro, A.; Verheggen, F. J.; Hemptinne, J. L.; Hutchison, W. D.; & Riddick, E. W. The chemical ecology of *Harmonia axyridis*. *BioControl*, 2011, 56.4: 643-661.

- SLOGGETT, John J., HONĚK, Alois. Genetic studies. *Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*. Blackwell, Chichester, 2012, 13-53.
- SMITH, B. C. Significance of variation in the weight, size and sex ratio of coccinellid adults. *Ecology of Aphidophagous Insects*. Academia, Prague, 1966, 249-251.
- STAVERLOKK, A.; SAETHRE, M.; HAGVAR, E. B. A review of the biology of the invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae). *Norwegian Journal of Entomology*, 2007, 54.2: 97.
- STEWART, L. A.; DIXON, A. F. G. Why big species of ladybird beetles are not melanic. *Functional Ecology*, 1989, 165-171.
- STOCKS, Ian C.; LINDSEY, Derek E. Acute corrosion of the oral mucosa in a dog due to ingestion of Multicolored Asian Lady Beetles (*Harmonia axyridis*: Coccinellidae). *Toxicon*, 2008, 52.2: 389-391.
- SU, Wang; Michaud, J. P.; Xiaoling, T.; Murray, L.; & Fan, Z. Melanism in a Chinese population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): A criterion for male investment with pleiotropic effects on behavior and fertility. *Journal of insect behavior*, 2013, 26.5: 679-689.
- SUN, Jiyu; Wu, W.; Xue, W.; Akhtar, R.; Ren, L.; & Tong, J. Quantitative nanomechanical properties of the cuticle of the multicolored Asian lady beetle using the modulus mapping technique. *Current Nanoscience*, 2015, 11.2: 245-252.
- TAN, C. C. Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the lady-bird beetle, *Harmonia axyridis*. *Genetics*, 1946, 31.2: 195.
- TAVARES, Isabelle I. Laboulbeniales (Fungi, Ascomycetes). Braunschweig: Cramer, 1985.
- TELENGA, N. A.; BOGUNOVA, M. The more important predators of scale insects and aphids of ussurian part of Far East Region and the ways of their use. *Plant Protection*, 1936, 75-87.
- THAXTER, Roland. Supplementary note on North American Laboulbeniaceae. In: *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*. American Academy of Arts & Sciences, 1889. p. 261-270.

- TRULLAS, Susana C.; VAN WYK, Johannes H.; SPOTILA, James R. Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 2007, 32.5: 235-245.
- UENO, H.; SATO, Y.; TSUCHIDA, K. Colour-associated mating success in a polymorphic Ladybird Beetle, *Harmonia axyridis*. *Functional Ecology*, 1998, 12.5: 757-761.
- VALENTINE, Barry D. Grooming behavior in Coleoptera. *The Coleopterists' Bulletin*, 1973, 63-73.
- VERSHININ, Alexander. Biological functions of carotenoids-diversity and evolution. *Biofactors*, 1999, 10.2-3: 99-104.
- VESELÝ, Petr; Ernestová, B.; Nedvěd, O.; & Fuchs, R. Aposematismus naruby: vrabci se v přírodě učí žrát toxickou kořist. In Bryja, J., Sedláček, F., Fuchs, R., *Zoologické dny České Budějovice 2016. Sborník abstraktů z konference*. 1. vyd. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v. v. i., 2016, s. 26. ISBN 978-80-87189-20-7.
- VIA, Sara; Gomulkiewicz, R.; De Jong, G.; Scheiner, S. M.; Schlichting, C. D.; & Van Tienderen, P. H. Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology & Evolution*, 1995, 10.5: 212-217.
- VILCINSKAS, Andreas; MUKHERJEE, Krishnendu; VOGEL, Heiko. Expansion of the antimicrobial peptide repertoire in the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2013, 280.1750: 20122113.
- WALLACE, Matthew S.; HAIN, Fred P. Field surveys and evaluation of native and established predators of the hemlock woolly adelgid (Homoptera: Adelgidae) in the southeastern United States. *Environmental Entomology*, 2000, 29.3: 638-644.
- WANG, Su; Michaud, J. P.; Zhang, R.; Liu, S.; & Zhang, F. Seasonal cycles of assortative mating and reproductive behaviour in polymorphic populations of *Harmonia axyridis* in China. *Ecological Entomology*, 2009, 34.4: 483-494.
- WEIR, Alex; BEAKES, G. W. Correlative light and scanning electron microscope studies on the developmental morphology of *Hesperomyces virescens*. *Mycologia*, 1996, 677-693.
- WEIR, Alex; BEAKES, Gordon. An introduction to the Laboulbeniales: a fascinating group of entomogenous fungi. *Mycologist*, 1995, 9.1: 6-10.

- WEIR, Alex; BLACKWELL, Meredith. Molecular data support the Laboulbeniales as a separate class of Ascomycota, Laboulbeniomycetes. *Mycological Research*, 2001, 105.10: 1182-1190.
- WELCH, Victoria L.; Sloggett, J. J.; Webberley, K. M.; & Hurst, G. D. Short-range clinal variation in the prevalence of a sexually transmitted fungus associated with urbanisation. *Ecological Entomology*, 2001, 26.5: 547-550.
- WHISLER, Howard C. Experimental studies with a new species of Stigmatomyces (Laboulbeniales). *Mycologia*, 1968, 65-75.
- WITTKOPP, Patricia J.; BELDADE, Patrícia. Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2009. p. 65-71.
- WOLFE, Lorne M. Why alien invaders succeed: support for the escape-from-enemy hypothesis. *The American Naturalist*, 2002, 160.6: 705-711.
- WOLTERECK, Richard. Weitere experimentelle Untersuchungen i. über Artveränderung, spezielle über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. *Verh. Deutsch. Zool. Gesell*, 1909, 1.